Aus dem Zentrum für Kinderkrankheiten der Universität
Düsseldorf
Abteilung für Hämatologie und Onkologie
Leiter: Prof. Dr. U. Göbel

Mechanismus der anaphylaktischen Reaktionen auf l-Asparaginase bei Kindern mit ALL

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Ursula Fabry

1985

UNIV. LEIDEN BIBL.

gez.
Dekan: Prof. Dr. A. Hopf
Referent: Prof. Dr. V. Wahn
Korreferent: Prof. Dr. H. Zeidler

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung

1. Historischer Überblick 1
2. Chemischer Aufbau der l-Asparaginase 3
3. Wirkungsmechanismus der l-Asparaginase 4
4. Nebenwirkungen der l-Asparaginasetherapie 5
5. Wirkungen auf das Komplementsystem 9
6. Pharmakokinetik 10
7. Antikörper und Komplementsystem 11
   7.1. Antikörper 12
   7.2. Komplementsystem 14

II. Problemstellung 23

III. Patientengut und Methodik

1. Patientengut 24
2. Probengewinnung 26
3. Bestimmung spezifischer Anti-l-Asp-Antikörper 26
   3.1. Reagentien 26
   3.2. Testprinzip 27
   3.3. Durchführung 28
   3.4. Auswertung 28
   3.5. Standardisierung des aP - konjugierten Antikörpers 29
   3.6. Standardisierung der l-Asp-Konzentrationen 29
4. Komplementtechnologie
   4.1. Bestimmung von C3, C4 und Faktor B 30
   4.2. Elektrophoretische Methoden
      Reagentien 30
      Rocketelektrophorese zur Bestimmung von C3d 31
      Gekreuzte Immunelektrophorese (C3b) 34
      Immunelektrophorese (Faktor B-Spaltprodukte) 36
      Wasch- und Färbevorgänge 37

4.3. Hämolytische Komplementtitration
4.3.1. Gesamthämolytische Aktivität des klassischen Weges 39
4.3.2. Gesamthämolytische Aktivität des alternativen Weges 42
5. In vitro Experimente
5.1. Herstellung spezifischer IgG-Anti-l-Asp-Antikörper 44
5.2. Nachweis der Reinheit der l-Asparaginase 46
5.3. Kreuzreaktivität zwischen E.coli - und Erwinia - Asparaginase 47
6. Statistische Auswertung 47

IV. Resultate

1. Klinische Daten 48
2. Reinheit der l-Asparaginase 51
3. Verhalten spezifischer Antikörper gegen l-Asp 53
4. Beziehung zwischen der Höhe von Anti-l-Asp-Antikörpertitern und allergischen Reaktionen 58
5. Verhalten des Komplementsystems 59
5.1. - unabhängig von allergischen Reaktionen 59
5.2. - unter Infusionen mit allergischen Reaktionen 71
6. Zusammenhang von Komplementsystem und Antikörpern mit allergischen Reaktionen 74
7. Kreuzreaktivität zwischen E.coli - und Erwinia - Asparaginase - Antigen 75

V. Diskussion

1. L-Asparaginase - ein Medikament 78
2. Reinheit des Präparates 79
3. Bildung spezifischer Antikörper 79
4. Spezifische Antikörper und allergische Reaktionen 85
5. Mechanismus allergischer Reaktionen 87
6. Allgemeine Wirkungen auf das Komplementsystem 90
7. Kreuzreaktivität 92
8. Spekulation 93

VI. Zusammenfassung 94

VII. Literaturverzeichnis 95

Danksagung 103

Lebenslauf 104

I. Einleitung

1. Historischer Überblick über die Einführung der l-Asparaginase in die Therapie maligner Lymphome

Die ersten Schritte zur Entdeckung der Wirkung von l-Asparaginase auf Lymphosarkome wurden zu Beginn der fünfziger Jahre von Kidd und seinen Mitarbeitern getan. So stellten sie fest, daß in Mäuse implantierte Gardner's Lymphomzellen, Zellen des sog. 6C3HED - Lymphoms, durch die Gabe von Anti-6C3HED-Kaninchen-Antiserum, das, um es mit hämolytischem Komplement zu versehen, mit normalem Meerschweinchenserum gemischt worden war, in ihrem Wachstum inhibiert wurden. Dieser Effekt konnte durch die alleinige Gabe von normalem Meerschweinchenserum reproduziert werden. Es zeigte sich, daß die tumorinhibierende Wirkung durch Seren anderer Tierspezies, wie z.B von Hunden, Kaninchen oder Ratten, nicht induziert werden konnte und auch nur bei einigen spezifischen Lymphosarkomarten nachweisbar war (Kidd, 1953, I). Aus der Tatsache, daß experimentell in vitro keine Tumorzellremission erbracht werden konnte, schloß Kidd, daß es durch die noch unbekannte in Meerschweinchenserum enthaltene Komponente nicht zu einer direkten, etwa toxischen Beeinflussung der Tumorzellen, sondern über Veränderungen im tumortragenden Organismus zur Beeinflussung des Tumorzellwachstums kommen müsse (Kidd, 1953, II).

Als nächster Schritt wurde in verschiedenen Arbeitsgruppen angestrebt, die für die oben erwähnten Effekte verantwortliche Substanz zu identifizieren. Einen wesentlichen Beitrag hierzu lieferten Broome und seine Mitarbeiter, die unter Rückbesinnung auf eine Beobachtung Clementis (1922), daß sich nämlich Meerschweinchenserum vor allem durch seinen großen Gehalt an l-Asparaginase von dem anderer Säugetiere unterscheidet, l-Asparaginase

als die gesuchte Substanz isolieren konnten (Broome, 1961, 1963).
Der Arbeitsgruppe um Wriston, die diese Untersuchungen fortführte, gelang es 1964 nachzuweisen, daß der beschriebene cytostatische Effekt auch durch gereinigte l-Asparaginase - Präparationen aus E.coli zu erreichen ist (Mashburn und Wriston, 1964). Diese Untersuchung basierte auf der schon 1959 veröffentlichten Erkenntnis, daß bei E.coli als Mikroorganismus eine ungewöhnlich hohe l-Asparaginase - Aktivität zu finden ist.
Auf diesem Weg wurde ermöglicht, die l-Asparaginase in weit größerem Umfang herzustellen und zu verwenden. Nachdem in weiteren Studien die Wirksamkeit der E.coli - Präparationen bei Säugetieren, wei z.B. Hunden (Old, 1967), und auch bei menschlichen Leukämien und Lymphosarkomen (Oettgen, 1967) untermauert werden konnte, fand diese Enzympräparation fortan einen festen Platz in der Behandlung menschlicher,insbesondere kindlicher Leukämien.
Bis heute ist die l-Asparaginase Gegenstand zahlreicher Untersuchungen, was u.a. sicherlich begründet ist in dem Phänomen einer spezifisch gegen bestimmte, proliferierende Tumorzellen gerichteten Therapie. So wurden unter anderem 1981 von Wehinger (Wehinger et al., 1981) bei leukämiekranken Kindern unter l-Asparaginase - Behandlung mehr Remissionen festgestellt als ohne l-Asparaginase - Behandlung. Andererseits veröffentlichten im gleichen Jahr Holland und seine Mitarbeiter eine Studie (Holland et al., 1981), nach der die Zahl der Remissionen unter l-Asparaginase - Behandlung nicht gesteigert werden kann, die Dauer eingetretener Remissionen jedoch verlängert werden kann. Hierbei wurde zusätzlich erneut die schon zuvor gemachte Feststellung bestätigt, daß die Effektivität der l-Asparaginase durch eine zeitlich festgelegte Kombination mit anderen Medikamenten, hier Vincristin und Prednison gesteigert werden kann (Bierling 1970; Burchenal, 1970).

Trotz der von Beginn der Therapie mit diesem Medikament an häufig beobachteten Auslösung von Überempfindlichkeitsreaktionen als therapielimitierenden Nebenwirkung, scheint der Einsatz von l-Asparaginase aufgrund ihres spezifischen Wirkungsmechanismus unverzichtbar zu sein. So ist dieses Präparat auch Bestandteil neuerlicher Therapieprotokolle (Winkler et al., 1983).

2. Chemischer Aufbau der l-Asparaginase

Bei der Untersuchung verschiedener l-Asparaginase - Präparationen aus E.coli fanden Irion und Arens (Irion und Arens, 1970), daß dieses Enzym aus 4 Isoenzymen aufgebaut ist, die unterschiedliche spezifische Aktiviät und Molekulargewicht haben. Dabei unterscheiden sich die von verschiedenen E.coli - Stämmen gewonnenen Präparationen nur wenig, nämlich bezüglich der Menge der einzelnen Isoenzyme. Bei weiterer säulenchromatographischer Auftrennung zeigte sich, daß der mit 8o % größte Proteinanteil der l-Asparaginase und zugleich der Teil mit der höchsten spezifischen Aktivität ein Molekulargewicht von ca. 120000 hat. Die anderen mengenmäßig weniger vertretenen Fraktionen zeichnen sich durch Molekulargewichte von 240000 und mehr und beträchtlich niedrigere spezifische Aktivität aus. Nach Säurespaltung ist bei allen l-Asparaginase - Präparaten gleichermaßen ein Ausgangsprotein mit einem Molgewicht von ca. 22000 nachzuweisen, was mit Beobachtungen anderer Autoren übereinstimmt (Whelan et al., 1969).
Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, daß in allen untersuchten Präparaten neben der l-Asparaginase - auch eine l-Glutaminase - Aktivität meßbar war. Diese blieb nach verschiedenen Reinigungsvorgängen und Inaktivierungsversuchen untrennbar von der l-Asparaginase - Aktivität mit anteilig konstant zwischen 3 - 4 % nachweisbar. Daraus wurde gefolgert, daß die l-Glutaminase - Aktivität nicht auf Verunreinigungen der Präparate,

sondern auf der relativen Unspezifität des aktiven Zentrums der l-Asparaginase beruht (Campbell et al., 1969, Irion et al., 1970).

3. Wirkungsmechanismus der l-Asparaginase

Wie durch die Studien an 6C3HED-Lymphomzellen gezeigt werden konnte (Broome, 1963, II), wirkt l-Asparaginase im Rahmen der Tumortherapie über die Erniedrigung des extracellulären Asparaginspiegels. Asparaginase - empfindliche Tumorzellen sind nicht dazu in der Lage, das für ihre Proteinbiosynthese notwendige Asparagin in ausreichendem Ausmaß selbst zu synthetisieren. Broome stellte fest, daß Asparaginase - empfindliche 6C3HED-Zellen nach der weiteren Züchtung in asparagin-freiem Medium bei Implantation auf Mäuse nicht länger empfindlich auf die Gabe von l-Asparaginase reagierten. Diese Zellen waren nach der beschriebenen Kultivierung befähigt, verstärkt endogenes Asparagin zu bilden und zur Proteinbiosynthese heranzuziehen. Durch dieses Experiment können Unterschiede bezgl. der Effektivität der Asparaginase bei verschiedenen Tumoren erklärt werden. Die bei bestimmten Neoplasien wirksame Erniedrigung der freien Asparaginkonzentration führt bei gesunden, "normalen" Zellen, die ohnehin unabhängig von exogen zugeführtem Asparagin sind, zu keiner Wachstumshemmung.

Neben dieser direkten Wirkung von l-Asparaginase auf bösartige Zellen konnten mehrere Autoren immunsuppressive Wirkungen nachweisen. So erstellte Chakrabarty (Chakrabarty et al., 1970), nachdem tierexperimentell eine Immunsuppression bzgl. der humoralen wie auch der zellulären Abwehr belegt werden konnte, die Theorie, daß die bei Immunreaktionen maßgeblichen Leuko- bzw. Lymphocyten als Zellen mit spezifischen Funktionen ähnlich wie die Tumorzellen kennzeichnend für die Sensibilität auf Asparaginasegabe hin mit einer Funktions-einbuße reagieren. Die für die Auslösung der Immun-suppression notwendigen Asparaginasemengen liegen im

Bereich der in der heutigen Tumortherapie gebräuchlichen Dosen. Zahlreiche andere Autoren bestätigen anhand von Versuchen zur Transplantatabstoßung bei Mäusen, die sich unter l-Asparaginasegabe als verzögert erwies (Lauenstein et al., 1970; Maral et al., 1970), und anhand von Provokationsversuchen mit verschiedenen Antigenen, also normalerweise Immunreaktionen auslösenden Substanzen (Schäffner et al., 1977), die o.g. Ergebnisse; dabei steht die Überprüfung des Wirkungsmechanismus der l-Asparaginase auf die zum Immunsystem gehörigen Zellen noch aus.

4. Nebenwirkungen der l-Asparaginasetherapie

Die unter l-Asparaginase auftretenden Nebenwirkungen können in zwei Gruppen gegliedert werden: die toxischen Wirkungen und die Hypersensitivitätsreaktionen.

Die von einigen Autoren beschriebenen toxischen Effekte (Carbone et al., 1970; Loeb et al., 1970) manifestieren sich im wesentlichen folgendermaßen: Die am häufigsten beobachteten Probleme bestehen in cerebraler Verwirrtheit (vorwiegend bei erwachsenen Patienten), Erbrechen, Übelkeit und anderen gastrointestinalen Symptomen. Nachfolgend werden Leberfunktionsstörungen von der Erhöhung spezifischer Serumparameter wie z.B. der alkalischen Phosphatase, Bilirubin und SGOT, bis zur histologisch gesicherten toxischen Hepatitis mit fettiger Degeneration genannt. Desweiteren treten Veränderungen im Gerinnungssystem mit Verlängerung von Zeitparametern (PTT ...) und speziell der Verminderung bestimmter Gerinnungsfaktoren (I, II, V, IX, X) auf, die jedoch in der Regel nicht zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen (Deutsch et al., 1970; Ramsay et al., 1977). Unter l-Asparaginasegabe entstehende Hyperglykämien werden von Carpentieri (Carpentieri et al., 1978) mit einem Rückgang der Insulinrezeptoren erklärt und sind genau wie alle anderen obengannten Effekte nach Beendigung der Therapie reversibel. Eine besondere Rolle spielt die nicht in

allen Studien beschriebene Pankreatitis. Sie tritt in der Regel innerhalb weniger Tage nach Therapiebeginn dosisunabhängig auf und kann als nekrotisierende Pankreatitis letal verlaufen. Da diese Nebenwirkung auf Verunreinigungen des Präparates zurückgeführt wurde.(Hamilton-Fairley et al., 1970), scheint sie bei der heutigen Verwendung von Asparaginase mit hoher spezifischer Aktivität von untergeordneter Bedeutung zu sein. Nierenfunktionsstörungen wurden lediglich infolge der verstärkten Anflutung von Zellabbauprodukten in Form eines gesteigerten Harnsäurespiegels genannt. Von nicht zu unterschätzender Bedeutung ist das Fehlen einer häufig die Tumortherapie limitierenden Erscheinung, das Fehlen der Knochenmarkdepression. Dieser Faktor favorisiert die l-Asparaginase in besonderer Weise zur Kombination mit anderen Zytostatika, ohne die Gesamttoxizität zu steigern.

Eine weitere regelmäßig auftretende Nebenwirkung der l-Asparaginasetherapie besteht in der Auslösung allergischer Reaktionen. Da Asparaginase als Enzymprotein von E.coli ein Fremdeiweiß für den menschlichen Organismus darstellt, ist diese Nebenwirkung nicht unerwartet. Im Wechselspiel Immunsuppression durch l-Asparaginase (s.o.) und Antigenität scheint im Bereich der gängigen Dosierung immer zweiteres als bestimmender Faktor zu überwiegen (Maral, 1971), so daß es zur Bildung spezifischer Antikörper kommen kann. Durch Kombination mit anderen immunsuppressiven Medikamenten wie Vincristin und Prednison kann dieses Gleichgewicht verschoben werden, so daß seltener anaphylaktische Reaktionen beobachtet werden. Die Gabe von intravenösen Testdosen vor den eigentlichen Asparaginaseinfusionen zeigte sich als prädiktive Maßnahme bislang nur als bedingt geeignet, da nur bei etwa 1/7 der Patienten mit Reaktionen während der Infusionen schon nach der Testdosis Auffälligkeiten zutage treten (Evans et al., 1982).
Eine andere diskutierte Möglichkeit zur Verringerung der Nebenwirkungen der Asparaginase ist die intramuskuläre

statt der intravenösen Applikation. Zum Teil wurden Ergebnisse veröffentlicht, nach denen die intramuskuläre Verabreichung von l-Asparaginase tatsächlich mit geringeren Nebenwirkungen verbunden sein soll (Nesbit et al., 1979). Andererseits zeigten nachfolgend andere Autoren, daß etwaige allergische Reaktionen unter intramuskulärer Applikation lediglich zu einem späteren verzögerten Zeitpunkt auftreten würden und daher eine längere Beobachtungsperiode notwendig sei (Spiegel et al., 1980).

Den Mechanismus der hypersensitiven Reaktionen betreffend wurde festgestellt, daß diese assoziiert sind mit dem Nachweis spezifischer Antikörper (Khan et al., 1969; Peterson et al., 1971). Dabei wurden im wesentlichen zwei Arten von Antikörpern nachgewiesen, IgE - und bivalente IgG - Antikörper, wobei die IgE - Antikörper soweit beurteilbar nicht mit allergischen Geschehnissen korreliert sind (Killander et al., 1976). Einige Autoren haben in der Vergangenheit daran gearbeitet, den Nachweis spezifischer Anti-l-Asparaginase-Antikörper zu vervollkommnen (Elhag et al., 1977), in der Hoffnung, eine prädiktive Aussage bzgl. des Auftretens anaphylaktischer Reaktionen treffen zu können; bis heute ist jedoch keine eindeutige Korrelation zwischen der Höhe der Antikörpertiter und der Wahrscheinlichkeit für das Auftreten allergischer Reaktionen herstellbar (Dellinger et al., 1976).

Neben dem Vorkommen hypersensitiver Reaktionen hat eine stattfindende Antikörperbildung auch eine andere wichtige Bedeutung. Es gibt Anhaltspunkte dafür, daß die l-Asparaginase durch die Bindung an die spezifischen Antikörper inaktiviert wird und dadurch bei wachsender Zahl der Infusionen und zunehmendem Antikörpergehalt eine Resistenz des Tumors gegenüber der Behandlung vorgespiegelt wird (Vadlamudi et al., 1971; Khan et al., 1969; Dohlwitz et al., 1970). Es sei an dieser Stelle noch einmal auf den anderen diskutierten Mechanismus der Resistenzentwicklung hingewiesen: Laut Canellos (Canellos et al.,

1969) waren bei Patienten, die im Verlauf der Therapie nicht mehr auf l-Asparaginase ansprachen, erhöhte intracelluläre Asparaginspiegel meßbar. Die Unwirksamkeit der Asparaginase kann in diesen Fällen mit der Induktion einer Asparagin-Synthetase erklärt werden. Zu guter letzt muß ein den Einsatz der Asparaginase erleichterndes Phänomen besprochen werden. Die beobachteten hypersensitiven Reaktionen mit Hauterscheinungen, Übelkeit, Kreislaufzusammenbrüchen etc. hatten bislang keine Todesfälle zur Folge. Aber nach dem Auftreten solcher Reaktionen, was in der Literatur mit bis zu 33 % aller Fälle beziffert wird (Killander et al., 1976), sollte die weitere l-Asparaginasetherapie abgebrochen werden. Es gibt jedoch neben der Präparation aus E.coli kommerzielle Präparate von Erwinia carotovora, mit denen die Behandlung wie nachfolgend erläutert in den meisten Fällen fortgeführt werden kann. In den bisher diesbezüglichen getätigten Studien konnte überwiegend keine Kreuzreaktivität zwischen der E.coli - und der Erwinia - Asparaginase nachgewiesen werden (Khan et al., 1969; Hamilton-Fairley et al., 1970); lediglich in einer Untersuchung erwiesen sich Patienten mit allergischen Reaktionen auf E.coli - Asparaginase auch stärker gefährdet in Bezug auf Erwinia - Asparaginase (Evans et al., 1982). In der gleichen Studie wurde im übrigen eine schon früher bekannte Erscheinung gefunden, daß nämlich die Gefahr einer anaphylaktischen Reaktion nach einer Bahandlungspause innerhalb der l - Asparaginasetherapie gesteigert ist (Jacquillat et al., 1970). Abschließend bleibt festzustellen, daß der Mechanismus der Auslösung hypersensitiver Reaktionen durch l-Asparaginase noch einer endgültigen Klärung bedarf, wobei die nachzuweisenden spezifischen Antikörper sicherlich im Zusammenhang mit diesen Reaktionen zu sehen sind (Dellinger et al., 1976).

5. Wirkungen der l-Asparaginase auf das Komplementsystem

Wichtige Untersuchungen zu Veränderungen des Komplementsystems bei Patienten mit Krebserkrankungen wurden 1976 veröffentlicht. Danach sind bei diesen Patienten allgemein Komplementspiegel wie C3 und C4, sowie z.B. CH50 als Globaltest erhöht. Das wurde einerseits unter dem Gesichtspunkt, daß eine quantitative Abhängigkeit der Erhöhung vom Krankheitsstadium erkennbar war, sozusagen als " Tumomarker " betrachtet (Verhaegen et al., 1976), während andererseits ein Inhibitor, der besonders die Komplementutilisation auf dem alternativen Komplementweg blockieren soll, postuliert wurde (Kalwinsky et al., 1976). Unter cytostatischer Therapie und im Verlauf der Remissionen zeigten sich die Komplementspiegel übereinstimmend als rückläufig.

Auch bei Patienten unter l-Asparaginasetherapie ist eine Erniedrigung einzelner Komplementkomponenten vorhanden. Hier kommt der Unterscheidung möglicher Ursachen, nämlich entweder der verminderten Synthese der Faktoren oder eines erhöhten Verbrauchs im Rahmen einer Komplementaktivierung, besondere Bedeutung zu. Eine Komplementaktivierung könnte naheliegenderweise durch die meßbaren spezifischen Antikörper gegen Asparaginase mit nachfolgender Immunkomplexbildung initiiert sein. In der vorliegenden Studie waren Spaltprodukte, die die Theorie einer Komplementaktivierung unterstützt hätten, nicht nachweisbar. Daraus wurde gefolgert, daß l-Asparaginase in Form einer partiellen Synthesehemmung in das Komplementsystem eingreift, wie es parallel auch im Gerinnungssystem wahrscheinlich ist (Shapiro et al., 1979). Innerhalb von zwei Wochen nach Beendigung der Behandlung gingen die Effekte auf das Komplementsystem wieder zurück. Patienten mit allergischen Reaktionen wurden in der genannten Studie nicht untersucht.

6. Pharmakokinetik der l-Asparaginase

Nach intravenöser Applikation verteilt sich l-Asparaginase schnell im Extracellulärraum; später ist sie in fast allen Organen mit Ausnahme des Gehirns nachweisbar. Der Eliminationsmechanismus ist noch weitgehend unklar, gesichert ist lediglich, daß er annähernd einer Kinetik erster Ordnung folgt. Auch nach hohen Dosen ist keine Asparaginaseausscheidung im Urin belegbar. Eine etwaige Elimination über das Lymphsystem ist nach tierexperimentellen Messungen, bei denen nur ein Bruchteil der zu erwartenden Werte in der Lymphflüssigkeit reproduziert werden konnte, nicht wahrscheinlich.
Es wurde diskutiert, daß die Asparaginase rapide das Kapillarendothel durchdringt und vom Retikuloendothelialen System aufgenommen wird (Hall, 1970). Diese Penetrationsfähigkeit soll bei E.coli - Asparaginase stärker ausgeprägt sein als bei Erwinia - Asparaginase, was begründet wurde mit der Neigung des zweiteren zur Aggregatbildung; erstaunlicherweise wurde an gleicher Stelle die Halbwertszeit der E.coli - Asparaginase im Vergleich als länger angegeben.
Insgesamt differieren die in der Literatur zu findenden Halbwertszeiten (HWZ) nach intravenöser Applikation hochgradig voneinander. Einige Autoren wiesen darauf hin, daß die HWZ unter anderem stark von den verwendeten Präparaten - Bayer, Merck, Squibb - abhängig sind, sowie daß die große Varianz der HWZ bei Tierversuchen schon innerhalb verschiedener Spezies nur eine geringe Übertragung der Ergebnisse auf menschliche Verhältnisse zulässt. Außerdem soll die Elimination der Asparaginase nach mehrmaliger Verabreichung zunehmend beschleunigt sein, was an die Bildung spezifischer Antikörper denken läßt (Pütter et al., 1969).
Die variierende Eliminationsgeschwindigkeit verschiedener Präparate wurde auch in Zusammenhang gebracht mit deren

durch verschiedene Präparationstechniken entstehenden isoelektrischen Punkten: Je niedriger dieser sei, desto kürzer sei die HWZ (Mashburn et al., 1970).
Eine im mittleren Bereich liegende HWZ des von uns benutzten Asparaginasepräparates - Crasnitin^{R}, Bayer - nach intravenöser Verabreichung beim Menschen wurde 1970 in einer Studie mit 11,2 ± 2,7 Stunden angegeben (Schwartz, 1970). Von unserer Studiengruppe wurden Ergebnisse zur Kinetik des gleichen Medikamentes erarbeitet, nach denen die mittlere Halbwertszeit bei 5,5 Stunden bei Patienten ohne meßbare spezifische Antikörper anzusiedeln ist. Bei Patienten mit mäßig erhöhten Antikörperspiegeln war diese sogar auf 7 Stunden verlängert, wonach ein weiteres Vorhandensein funktioneller Aktivität der Asparaginase auch nach Immunkomplexbildung zusammen mit gleichzeitig verzögerter Elimination glaubhaft scheint (Wahn et al., 1983). Das steht im Gegensatz zu anderen Beobachtungen, in denen von einem beschleunigten Funktionsverlust der Asparaginase bei Vorhandensein von Antikörpern gesprochen wurde (s.o., Nebenwirkungen).

7. Antikörper und Komplementsystem

Im vorangehenden Teil der Einleitung habe ich bereits ausführlich dargelegt, welch bedeutende Rolle l- Asparaginase-spezifische Antikörper im Zusammenhang mit der Therapie mit l-Asparaginase spielen. Diese Antikörper können mit den entsprechenden Antigenen Immunkomplexe bilden, die wiederum erhebliche Auswirkungen auf das Komplementsystem zeigen und auf diesem Weg allergische Reaktionen auslösen können. Daher möchte ich im folgenden Teil zur Erläuterung der Fragestellung der Arbeit einen kurzen Überblick über wichtige Zusammenhänge zwischen Antikörpern und dem Komplementsystem geben.

7.1. Antikörper

Beim Menschen sind 5 Immunglobulinklassen bekannt: IgG, IgM, IgA, IgE und IgD. Diese Immunglobuline haben folgende Strukturmerkmale miteinander gemeinsam: Sie sind symetrisch aufgebaut und bestehen aus zwei gleichlangen, sog. schweren Ketten (heavy chains = H-Ketten) und zwei gleichlangen, ca. halb so großen, sog. leichten Ketten (light chains = L-Ketten). Die L-Ketten flankieren die H-Ketten vom N-terminalen Ende der Polypeptidkette her und werden an diesen durch verschiedene Arten chemischer Bindungen festgehalten. Hierdurch werden zwei sog. Fab-Teile gebildet; die noch freien Hälften der H-Ketten formieren den sog. Fc-Teil.
Der strukturelle Grundbaustein, aus dem sowohl H- wie auch L-Ketten aufgebaut sind, ist eine in ungefähr gleicher Weise räumlich gefaltete Polypeptidkette (Domäne) mit jeweils etwa 110 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ca. 12 KD. Die L-Ketten sind immer aus zwei solcher Domänen aufgebaut, während die H-Ketten des IgG beispielsweise 4 und diejenigen von IgM oder IgE 5 Domänen beinhalten. Die Domänen sind über kurze, bewegliche Stücke der fortlaufenden Polypeptidkette verbunden.
In den jeweils ersten vom Aminoende her betrachteten Domänen gibt es veränderliche Sequenzanteile, während die übrigen innerhalb einer Immunglobulinklasse gleichbleibende Aminosäuresequenzen aufweisen. In den variablen Sequenzen gibt es wiederum 3 - 4 hypervariable Bezirke, die wahrscheinlich für die Spezifitätsvielfalt zur Bindung von Antigenen verantwortlich sind. Die Bindung von Antigenen erfolgt durch L- und H-Ketten gemeinsam.
Für die Interaktion zwischen Antigen und Antikörper ist auch das sog. Gelenkstück (hinge region) von großer Bedeutung, da dieses eine ausreichende Beweglichkeit der Fab-Teile gewährleistet.

Neben diesen Gemeinsamkeiten gibt es aber auch wesentliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Immunglobulinklassen, sowohl die Struktur als auch die Funktion betreffend. In Orientierung am Gegenstand dieser Studie soll an dieser Stelle

nur auf IgM und IgG näher eingegangen werden.
IgM, der bei einer Immunantwort zuerst auftretende Antikörper, besitzt eine pentamere Struktur; die einzelnen 7 s Einheiten werden durch ein 25 KD schweres Peptid zusammengehalten. Das IgM hat mit ca. 10 Tagen eine relativ kurze HWZ. 80 % der Gesamtmenge liegen im Intravasalraum vor und dienen dort der akuten Infektabwehr.
Beim IgG gibt es vier Subklassen, die sich hauptsächlich in der Anordnung ihrer Disulfidbrücken unterscheiden. Es bestehen aber auch Unterschiede bzgl. der Primärstruktur, die einige wesentlich biologische Differenzen zur Folge haben. Beispielsweise ist IgG 4 nicht in der Lage, Komplement zu binden, auch kann es nicht an Makrophagen angelagert werden. Studien des Katabolismus von IgG ergaben eine durchschnittliche Halbwertszeit von 18 - 23 Tagen. Nur 45 % der Gesamtmenge des IgG zirkulieren im Blut; der Rest befindet sich extravasal und steht für die lokale Abwehr von Erregern zur Verfügung. Der Abbau erfolgt wahrscheinlich zum überwiegenden Teil in Darm und Leber.

Neben der Bindungsfähigkeit von Antigenen am Fab-Teil haben die Antikörper auch Funktionen, die sie über den Fc-Teil ausüben. So wird hierüber unter anderem das Komplementsystem aktiviert oder die Bindung an Makrophagen vermittelt, wodurch die Clearance von Immunkomplexen gesteigert werden kann. Außerdem reguliert IgG mit seinem Fc-Teil im Sinne eines hemmenden Feedback-Mechanismus seine eigene Biosynthese (Hoffmann et al., 1974).

7.2. Komplementsystem

Der Begriff " Komplement " wird einem System von Faktoren zugeordnet, die im normalen Serum vorkommen, einem charakteristischen Aktivierungsmodus unterliegen und eine Vielzahl biologisch wichtiger Vorgänge vermitteln.

Die biologischen Hauptfunktionen des Komplementsystems bestehen in der Mediation von:

1. unspezifischen Abwehrvorgängen z.B. gegenüber Bakterien,
2. der Elimination von Immunkomplexen und
3. der Vermittlung anaphylaktischer Reaktionen.

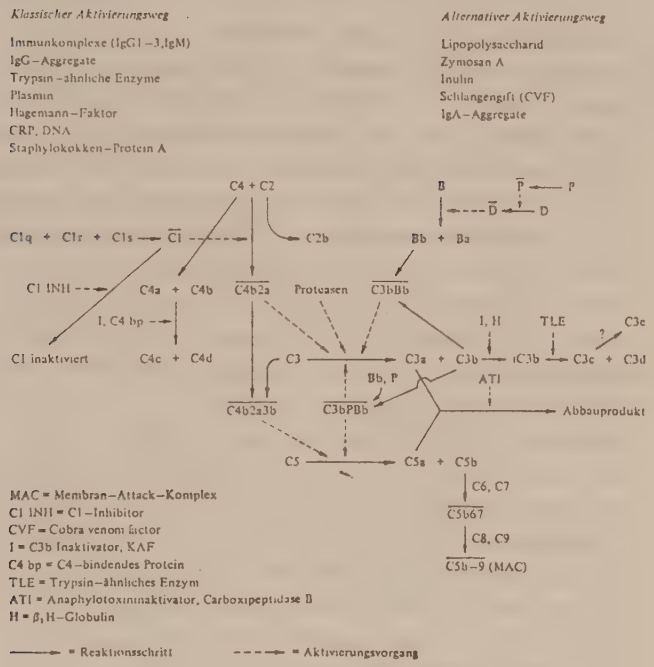
Die meisten dieser Vorgänge sind Zellmembran - orientiert, d.h. über Veränderungen der Zellmembraneigenschaften wird die Lyse der jeweiligen Zielzellen herbeigeführt.

Die Biosynthese der zum Komplementsystem gehörigen Faktoren erfolgt in zahlreichen Geweben und Zellarten, wie Makrophagen, Fibroblasten, intestinalen Epithelzellen, Leberzellen, peripheren Lympho-, Monocyten und vermutlich noch vielen anderen (Porter et al., 1979).

Die Faktoren finden sich unter physiologischen Bedingungen als inaktive Vorläufer im Blut, wobei eine ständige, geringgradige und kompensierte Aktivierung wie bei allen natürlichen Gleichgewichtssituationen toleriert wird. Ähnlich den Gerinnungsfaktoren werden sie über einen spezifischen, kaskardenartig ablaufenden Aktivierungsmodus in die enzymatisch aktive Form überführt. Hierbei ist jede Stufe in der Regel mit der begrenzten Proteolyse des Proenzyms verbunden, wie aus dem folgenden Schema zu ersehen ist (Fig. 1):

Fig. 1 : Das Komplementsystem (vereinfachte Darstellung)

(entnommen aus V.Wahn: Hereditäre Komplementdefekte. Monatsschr Kinderheilkd (1983) 131: 765-772)



Das hier schematisch dargestellte Komplementsystem kann eingeteilt werden in Aktivierungs -, Effektor - und Regulationsvorgänge.

Beginnend mit dem Aktivierungsteil ist zu unterscheiden zwischen dem klassischen und dem alternativen Komlementweg, die ihren Ausgang von verschiedenen Komponenten nehmen. Diese beiden Wege laufen einander parallel, bis sie in der gemeinsamen Endsequenz C3, C5 - C9 als biologische Effektoreinheit münden.

Die Komplementaktivierung auf klassischem Wege kann soweit bekannt in Gang gesetzt werden durch: Immunkomplexe (IgG 1 - 3, IgM), IgG-Aggregate, trypsinähnliche Enzyme, Plasmin, Hagemann-Faktor, CRP, DNA, Staphylokokken-Protein A und weitere Substanzen (Cooper, 1978). Davon abgesehen konnte auch eine Aktivierung allein durch autokatalytische Unformung des C1-Komplexes beschrieben worden (Ziccardi et al., 1982). Gemeinsam ist den oben genannten Aktivatoren die überwiegend auf ihrer Eigenschaft als Bestandteile von Membranantigenen beruhende Aktivierung des Komplementsystems durch Antigen-Antikörper-Reaktionen. Diesen Zielstrukturen lagert sich dabei C1q - vermittelt der C1-Komplex ($\overline{C1}$) als Erkennungseinheit an. Die Immunglobuline binden hier mit dem Fc-Teil an C1q, und zwar das IgG mit der CH2-Domäne (Ellerson et al., 1972) und das IgM mit der CH3-Domäne. Darüberhinaus unterscheiden sich verschiedene Subklassen bzgl. ihrer Bindungsfähigkeit, die beste besitzt IgG 3, während IgG 4 gar nicht bindet.

Der Komplex $\overline{C1}$ wird im Serum abhängig vom Vorhandensein von Calcium aus C1q, C1r und C1s gebildet. Nach Anlagerung der Zielstruktur kommt es durch molekulare Umformung zur Freilegung enzymatisch aktiver C1r-Anteile, die wiederum C1s durch proteolytische Spaltung in einen aktiven Komplementmediator überführen (Ziccardi et al., 1978). Auf diese Weise kann $\overline{C1}$ auf C4 und auf C2 einwirken. Durch Proteolyse werden sowohl in C4 als auch in C2 molekulare Bindungsstellen aktiviert und es resultiert eine Fusion der jeweils größeren Komponentenfragmente C2a und C4b. Der enzymatisch aktive Teil der entstandenen C3-Konvertase $\overline{C4b2a}$ ist das C2a, während C4b die Anhaftung an biologische Membranen und somit das zytolytische Potential des Komplexes garantiert (Müller-Eberhard, 1976).

Nachdem durch diese C3-Konvertase die Spaltung von C3 in C3a und C3b vollzogen ist, wird unter Einbeziehung des C3b erneut ein Komplex ($\overline{C4b2a3b}$), eine C5-Konvertase gebildet. Durch die Anlagerung des C3b wird die Substratspezifität des Enzyms auf die C5-Komponente hergestellt, wobei jedoch

wiederum das C2a den enzymatisch aktiven Teil des Enzyms darstellt. Die Wirkung der C5-Konvertase auf C5 initiiert die " Effektoreinheit " des Komplementsystems und dabei einen molekularen Assoziationsprozeß, an dessen Ende - ohne weitere Beteiligung enzymatischer Aktionen - die Bildung des Membran-Attack-Komplexes $\overline{C5b-9}$ steht.

Der molekulare Mechanismus der Aktivierung des alternativen Komplementweges ist bislang noch unklar. Sicher identifizierte beteiligte Faktoren sind der Faktor B (= C3 Proaktivator bzw. C3 Aktivator), Faktor D (= C3 Proaktivator-Konvertase) und C3. Der sog. Cobra venum-Faktor hingegen ist kein zusätzlicher Faktor, sondern entspricht dem Kobra - C3b.
Der alternative Weg kann aktiviert werden durch Immunkomplexe der IgA-Klasse, aggregiertes IgA, Schlangengift, Zymosan A, Endotoxine, Inulin, Kaninchenerythrocyten und vermutlich noch anderes mehr (Atkinson et al., 1980). Ebenso wie diese Substanzen nur schwer einem einheitlichen Mechanismus zuzuordnen sind, ist die Komplementaktivierung auf dem alternativen Weg nicht notwendigerweise an das Vorhandensein von Antikörpern gebunden.
Der als Erkennungseinheit oft diskutierte C3NeF (Nephritis-Faktor), der häufig in Verbindung mit der membranoproliferativen Glomerulonephritis Typ II oder einer partiellen Lipodystrophie angetroffen wird, wird nach neuerlichen Untersuchungen nicht mehr als Ausgangsaktivator angesehen (Daha et al., 1976). Die Zuordnung des sogenannten, dem Nephritis-Faktor bzgl. des immunochemischen Verhaltens und der Struktur analogen Initialfaktors ist noch ungewiß.
Insgesamt sind die ersten der wie auch immer gearteten Aktivierung nachfolgenden molekularen Umformungen noch weitgehend unbekannt, so daß die verschiedenen Vorstellungen hier differieren. Sicher ist jedoch, daß durch die Interaktion von Faktor D, modifiziertem Faktor B (Bb) und nativem C3 bei Mg^{++}- Anwesenheit ein Enzymkomplex mit C3 - Konvertase - Aktivität ($\overline{C3bBb}$) entsteht.
Durch Anlagerung von Properdin an den C3 - Kovertasekomplex wird einerseits dessen Spezifität, daß dieser neue $\overline{C3bPBb}$ - Komplex auch C5 - Konvertase - Kapazität erhält (Medicus

et al., 1976); zum zweiten wird auf diese Weise, wie auch seltener durch Anlagerung des oben erwähnten Nephritis-Faktors, der Zusammenhalt des Konvertase-Komplexes verstärkt. Über nachfolgende Beschränkungen der Abbaumöglichkeiten resultiert eine erhebliche Verlängerung der Halbwertszeit des $\overline{C3bP9b}$ (s. Fig. 2).

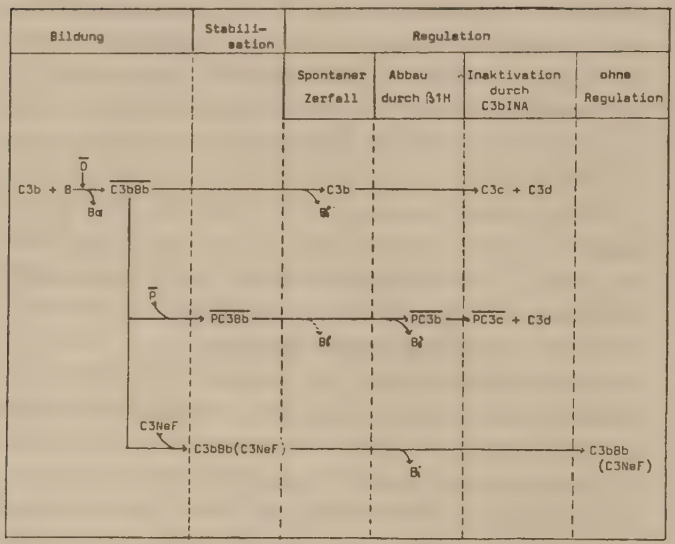


Fig. 2 : Schematische Darstellung der verschiedenen Regulationsvorgänge der Amplifikationskonvertase ($\overline{C3b8b}$)

Durch den Einbau von Properdin wird der normalerweise die Komplementaktivierung limitierende spontane Zerfall des $\overline{C3b8b}$ begrenzt. Erst durch die Inaktivierung durch den sog. C3b - Inaktivator (= I oder C3bINA), der seinerseits nur nach Umformung des Zielkomplexes mit β1H - Globulin (H)

angreifen kann, wird der Properdin - verstärkte - Komplex unter Abspaltung von Faktor B aufgelöst. Das C3b wird dabei in C3c und C3d umgewandelt (Weiler et al., 1976). Die hier beschriebenen Mechanismen bzgl. der C3b - Bildung und auch des Abbaus besitzen durch die Stellung des C3 bzw. des C3b als Bindeglied zwischen klassischer und alternativer Komplementaktivierung besondere Bedeutung. Man muß sich vergegenwärtigen, daß durch die Aktivierung auf beiden Wegen entstandenes C3b mittels der Bildung $\overline{C3bBb}$ erneut C3 in C3a und C3b spalten und sich so selbst regenerieren kann (Lanzer, 1981). Von dieser Verstärkerschleife her rührt die Bezeichnung des $\overline{C3bBb}$ als Amplifikationskonvertase.

Nach Entstehen der C5-Konvertasen - $\overline{C3bP\,Bb}$ und $\overline{C4b2a3b}$ - erfolgt der eigentliche Übergang der " Aktivierungseinheiten " in die " Effektoreinheit ". Innerhalb dieser Effektoreinheit, bestehend aus den Faktoren C5 - C9, kommt es nur noch einmal zu einer proteolytischen Spaltung, nämlich der Spaltung von C5 in C5a und C5b durch die erwähnten Konvertasen. Alle nachfolgen gebildeten Faktoren besitzen keine enzymatische Aktivität. So entsteht als Endprodukt ein aus allen Komponenten bestehender " Membran-Attack-Komplex " (MAC). Der MAC, in den die Faktoren in unterschiedlicher stöchiometrischer Menge integriert sind, ist dazu befähigt, transmembranöse Kanäle der jeweiligen Zielzellen zu öffnen (Müller-Eberhard, 1975). Die Umgehung hydrophob-hydrophiler Zellmembranbarrieren führt schließlich zur Zellyse.

Was den Regulationsteil des Komplementsystems betrifft, soll hier in Anbetracht der Vielfalt der beteiligten Wirkstoffe, nur auf die wesentlichsten Vorgänge eingegangen werden. Der C3b - Verstärker - Mechanismus (Amplifikationssystem) ist schon oben dargestellt worden; durch ihn wird im Fall einer schnellen Komplementaktivierung die notwendige Menge an reaktionsfähigem C3b bereitgestellt.
Die Komplementaktivierung erfährt desweiteren insgesamt eine Beschleunigung durch die mögliche Membranfixation verschiedener Zwischenprodukte (verbesserte Koordination). Als Gegengewicht zu derartigen fördernden Mechanismen und

der spontanen Komplementaktivierung fungieren einerseits der spontane Zerfall von Komplementfaktoren und insbesondere schwachgebundener Komplexe, und andererseits weitgehend spezifische Inhibitoren. Die wichtigsten sind der C1 - Inhibitor (C1 INH), β1H-Globulin (H), C3b Inaktivator (I) und das C4 - bindende Protein (C4 bp). Aus der Bezeichnung dieser Substanzen geht meist schon der jeweilige Angriffspunkt hervor.
Ein weiterer wichtiger Inaktivator ist der Anaphylatoxin-inaktivator (ATI), der für C3a und C5a substratspezifisch ist. Diese beiden Spaltprodukte entstehen durch C3 - bzw. C5 - Spaltung im Verlauf der Aktivierung. C3a und C5a zeigen als Anaphylatoxine eine kininähnliche u.a. die Gefäßpermeabilität steigernde Wirkung, wie sie auch bei entzündlichen Prozessen und allergischen Reaktionen beobachtet wird. Systemische Wirkungen in Form eines allergischen Schocks durch die obigen Anaphylatoxine werden jedoch durch die sofortige Inaktivierung nach Freiwerden der aktiven Substanzen mittels des ATI verhindert. Die nach der peptischen Spaltung entstandenen Substanzen zeigen keine anaphylatoxische Wirkung mehr, lediglich die ursprüngliche chemotaktische Wirkung von C5a bleibt erhalten. Anzumerken ist noch, daß in Tierversuchen Steigerungen der Atemfrequenz unter den obengenannten Bedingungen festgestellt wurden, die infolge einer respiratorischen Insuffizienz einen Kollaps auslösen können, der von einer etwaigen allergischen Reaktion unterschieden werden muß (Hugli et al., 1978).
Weitere bekannte Regulatorproteine werden der Übersichtlichkeit halber hier nicht besprochen.

Die allgemeine biologische Bedeutung des Komplementsystems ist schon an anderer Stelle zusammengefaßt worden; wichtige Funktionen einzelner Mediatoren werden in der folgenden Tabelle (Tab. 1) wiedergegeben.

Tab. 1 : Biologische Aktivitäten des Komplementsystems

(entnommen aus: V.Wahn, Hereditäre Komplementdefekte. Monatsschr Kinderheilkd (1983) 131: 765-772)

Wirkung	Mediator
Kinin	C2b
Immunadhärenz	C3b/C4b
Chemotaxis	C5a/C5b67
Anaphylaxie	C3a/C5a
Cytotoxizität a) durch C-Aktivierung nach Reaktion mit Antikörper b) durch "Reaktive" Lyse	C5b-9
Leukocytenmobilisierung	C3e
Leukocytenaggregation	C5a
Makrophagenaktivierung	Bb
Immunkomplexauflösung	C3b
Freisetzung lysosomaler Enzyme (PMN)	C3a/C5a
Freisetzung lysosomaler Enzyme (Makrophagen)	C3b

Ein grundlegendes Phänomen ist durch die Komponenten C3b und C4b mediierbar. Es kommt zustande durch die unspezifische labile Bindungsfähigkeit an phagocytierbare Partikelchen auf der einen Seite, die auch als " Opsonisation " bezeichnet wird, und an für C3b bzw. C4b spezifische Zellmembranrezeptoren auf der anderen Seite, so daß die beiden Faktoren gewissermaßen " Brücken " zwischen den Bindungspartnern bilden. C3b - und/oder C4b - Rezeptoren sind auf den Zellmembranen von B-Lymphocyten, neutrophilen Granulocyten, Monocyten, Makrophagen und auch Erythrocyten vorhanden. Die Konsequenz einer wie oben beschriebenen Anhaftung ist vom Charakter der beteiligten Zelle abhängig: Gehört diese beispielsweise dem dem RHS an, wird ihre Phagocytose-Aufgabe durch diese Opsonisation erheblich erleichtert (Ehlenberger et al., 1976). Den sich anschließenden Vorgang der Anlagerung von C3b und/

oder C4b enthaltenden Immunkomplexen an jene Zellen, die entsprechende Rezeptoren tragen, nennt man " Immunadhärenz " (Dierich et al., 1977; Czop et al., 1976). Diese ist zusätzlich von Immunglobulin - Fc - Teilen bzw. entsprechenden Rezeptoren abhängig. Sie leitet nicht nur die Immunkomplex-Phagocytose ein, sondern kann auch die Immunantwort beeinflussen, wenn durch die Anlagerung von Immunkomplexen an B-Lymphocyten der Kontakt des Antigens mit den für die Antokörperbildung zuständigen Zellen intensiviert wird (Klaus et al., 1977; Cooper, 1982).
Weitere Einwirkungen auf das humorale Immunsystem scheint das Spaltprodukt C3e zu haben, das als leukocytenmobilisierender Faktor zur Leukocytenfreisetzung aus dem Knochenmark führt (Ghebrehiwet et al., 1979).
Funktionen anderer Komplementfaktoren sind: die Anaphylatoxinwirkung von C3a und C5a (s.o.), die Kininwirkung von C2b und die Makrophagenaktivierung durch Bb.

Zum Schluß dürfen auch die funktionellen Zusammenhänge zwischen dem Komplementsystem und anderen Plasmaproteinsystemen, allen vorweg das Gerinnungssystem mit seinem ähnlichen kaskadenförmigen Aktivierungsablauf, nicht vernachlässigt werden.
Zu nennen sind unter anderem:
- die Aktivierung von $\overline{C1}$ durch Plasmin und den Hagemann-Faktor,
- die Spaltung von C3 und C5 unter Anaphylatoxinfreisetzung durch Plasmin und
- die Aktivierung des Hagemann-Faktors wiederum durch $\overline{C1}$.

Bekannt ist auch, daß das Komplementsystem einerseits an der Retraktion und Lyse von Blutgerinnseln beteiligt sein kann, andererseits aber über eine Schädigung von Thrombocyten zur Blutgerinnung beiträgt. Diese verschiedenartigen Aktivitäten entstehen auf verschiedenen Ebenen der Komplementaktivierung: Auf den frühen Aktivierungsstufen vor Bildung des MAC werden über Thrombocytenagglutination biogene Amine freigesetzt, die zur Retraktion des Gerinsels beitragen, und Plasmin aktiviert. Ist der MAC gebildet, kommt es zur Lyse der Thrombocyten und damit zum Freiwerden aktiver Gerinnungsfaktoren (Sundsmo et al., 1983). Derartige Zusammenhänge spielen eine besondere Rolle bei Diskussionen um die Entstehung des Schwartzmann-Sanarelli-Syndroms, der Serumkrankheit etc..

II. Problemstellung

In der Vergangenheit wurden regelmäßig allergische Reaktionen auf die Gabe von l-Asparaginase hin beobachtet. Des weiteren wurde die Bildung spezifischer Antikörper gegen l-Asparaginase beschrieben. Es konnte jedoch weder der Mechanismus dieser Reaktionen aufgeklärt werden, noch konnte eine eindeutige Beziehung zwischen dem Auftreten allergischer Reaktionen und der Titerhöhe der spezifischen Antikörper hergestellt werden.

Mit dieser Untersuchung sollte der Frage nachgegangen werden, ob und inwieweit allergische Reaktionen unter l-Asp - Therapie über eine Komplementaktivierung, bzw. durch eine solche initiiert, ablaufen. Wenn möglich sollten Komplementparameter erarbeitet werden, anhand deren Patienten mit allergischen Reaktionen von denen ohne unterschieden werden können. Mithilfe eines neuentwickelten ELISA - Testes zum Nachweis spezifischer Anti-l-Asp IgG - und IgM - Antikörper wurde erneut versucht, einen Zusammenhang zwischen Antikörpertiter und dem Risiko auftretender allergischer Reaktionen zu erstellen.

Bei früheren Untersuchungen des allgemeinen Einflusses von l-Asparaginase auf das Komplementsystem wurde eine Erniedrigung verschiedener Faktoren festgestellt, ohne daß ein Anhalt für eine Komplementaktivierung gefunden werden konnte.

Unter Zuhilfenahme der Bestimmung einer Vielzahl von Komplementparametern, sollten diese Ergebnisse dahingehend analysiert werden, ob durch l-Asparaginase eine Aktivierung oder eine Synthesehemmung des Komplementsystems verursacht wird. Außerdem wurde eine weitergehende Differenzierung der Asparaginasewirkungen bzgl, des klassischen und des alternativen Komplementweges angestrebt.

III . Patientengut und Methodik

1. Patientengut

Im Zeitraum von Oktober 1981 bis Oktober 1983 wurden die Seren von 24 Kindern im Alter von 3 bis 17 Jahren, die an akuter lymphoblastischer Leukämie erkrankt waren und in der Universitätskinderklinik Düsseldorf behandelt wurden, untersucht (s. Tab. 2). 13 der untersuchten Kinder waren weiblichen, 11 männlichen Geschlechts.
Die Patienten wurden behandelt nach dem Protokoll der Kooperativen ALL - Studie 1982 (COALL 82; Studienleiter K.Winkler und G.Landbeck, Universitätskinderklinik Hamburg). Diese Behandlung beinhaltet die Vielfachkombination von Zytostatika wie z.B. Vincristin (VCR), Adriamycin (ADR), Methotrexat (MTX), Asparaginase (ASP), Immunsuppression mit Methylprednisolon (MPR), ZNS - Bestrahlung und eine unterstützende Immunglobulingabe in festgelegter Dosis und zeitlichem Ablauf. Hierbei unterscheidet sich das Protokoll für Patienten der "high risk"- Gruppe von dem für Patienten der "low risk"- Gruppe. Definitionsgemäß gehören zur "low risk"- Gruppe alle Kinder, die älter als 2 und jünger als 7 Jahre sind, eine initiale Blastenzahl von weniger als 25000 / mm^3 Blut aufweisen und deren Erkrankung immunologisch als "common ALL Antigen positiv" (cALL Ag+) typisiert worden ist (Winkler et al., 1983). Die Aggressivität der Therapie ist bei den Patienten der "low risk"- Gruppe ausschließlich während der letzten Phase, dem sog. c-Abschnitt, der Induktion und der Reinduktion vermindert worden, so daß die Behandlung mit Asparaginase, die in der 2. Phase, dem sog. b-Abschnitt, ihren Platz hat, von dieser Unterscheidung unbeeinflusst bleibt. L-Asparaginase wird in Form eines Blocks aus viermal 3000 E / kg Körpergewicht intravenös appliziert; sie stellt zu diesem Zeitpunkt neben der Gabe von Immunglobulinen die einzige medikamantöse Maßnahme dar (Fig. 3).
Einige der beobachteten Patienten, die nach dem Pilot COALL 82

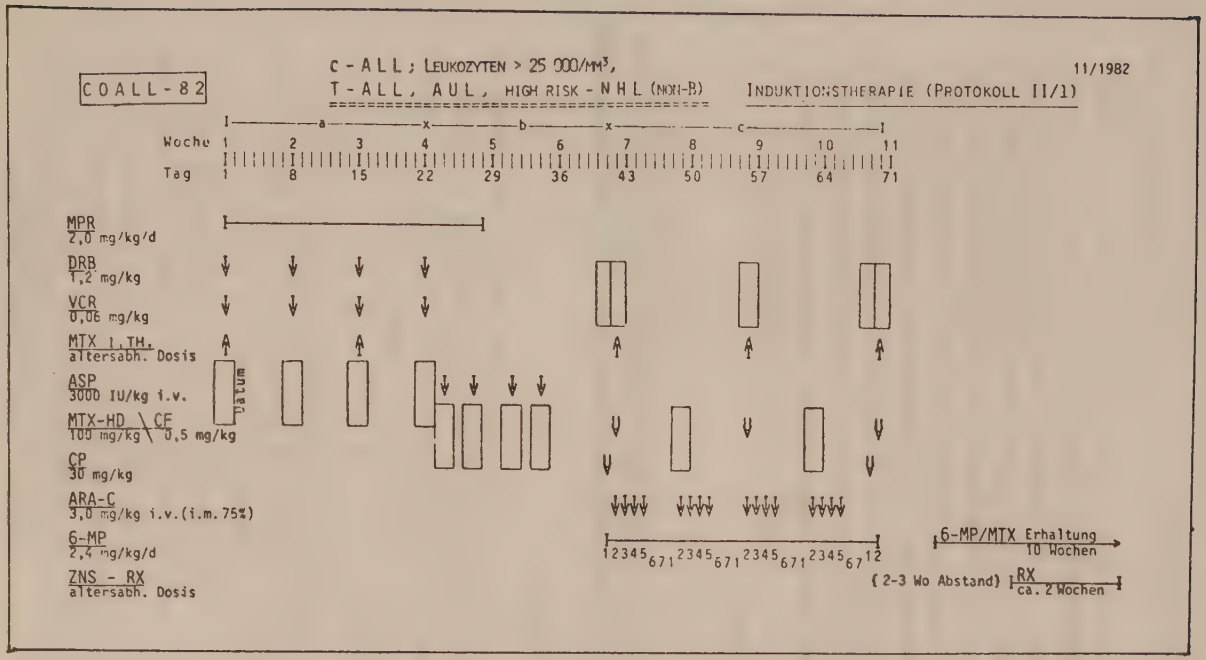


Fig. 3 :

Induktionstherapie nach dem COALL 82 - Protokoll bei Patienten der "high risk"- Gruppe

L-Asparaginase (ASP) wird in der 4. bis 6. Therapiewoche verabreicht.

Protokoll behandelt wurden, erhielten einen gleichartigen Asparaginaseblock zusätzlich während der Reinduktionsphase; nach der COALL 82 Studie wird Asparaginase in der Reinduktion nicht mehr verabreicht.

2. Probengewinnung:

Das Blut zur Gewinnung von Serum und EDTA-Plasma wurde über eine liegende Braunüle aus einer peripheren Vene gewonnen. Zur vollständigen Gerinnung wurde das Blut für die Serumgewinnung ca. 30 Minuten bei Zimmertemperatur belassen und dann 15 Minuten bei 700 g zentrifugiert. Das EDTA-Blut zur Gewinnung von Plasma wurde sofort nach der Entnahme zentrifugiert. Bis zur Bearbeitung wurden die Serum- und Plasmaüberstände in Aliquots bei -70°C eingefroren.

3. Bestimmung spezifischer Anti-l-Asp IgG- und IgM-Antikörper in den Seren der Patienten mittels eines solid phase ELISA:

3.1. Reagentien:

Diäthanolaminpuffer: 97 ml Diäthanolamin (Merck, Darmstadt), 800 ml Wasser, 0,2 g NaN_3, 0,1 g $MgCl_2 \times 6\ H_2O$ werden gemischt und mit 1n HCl auf pH 9,8 eingestellt. Anschließend wird das Ganze bis zu einem Volumen von 1 l mit Aqua dest. aufgefüllt.

Carbonat-Bicarbonat-Puffer: 1,59 g Na_2CO_3, 2,93 g $NaHCO_3$ und 0,2 g NaN_3 werden in einem Liter Aqua dest. gelöst. Der pH-Wert sollte 9,6 betragen.

Phosphat-gepufferte-Kochsalzlösung (PBS): 7,6 g NaCl, 150 mg KH_2PO_4 ,150 mg KCl, 1,15 g $Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$ werden bis zu einem Gesamtvolumen von 1 l in Aqua dest. gelöst. Die Ionenstärke dieser Lösung mit dem pH-Wert von 7,4 entspricht der physiologischen.

PBS-Tween: 0,05 % Tween 20 werden in PBS gelöst.

PBS-BSA-EDTA: Zu einem Volumenanteil 0,2 m EDTA - Stammlösung und neunzehn Volumenanteilen PBS wird 1 % Rinderalbumin (BSA) gegeben.

3.2. Testprinzip:

In Fig. 4 ist das Prinzip dieses neuen Testes schematisch dargestellt: L-Asp wird an eine feste Phase immobilisiert. Hieran binden sich die im Patientenserum befindlichen Anti-l-Asp IgG - bzw. IgM - Antikörper. Die Menge gebundener Antikörper wird bestimmt, indem an die immobilisierten Antikörper ein an alkalische Phosphatase gebundener Anti - Antikörper angelagert wird. Die Menge so gebundener alkalischer Phosphatase, die proportional zu der der immobilisierten Antikörper und somit der im Serum befindlichen Antikörper ist, wird durch die Reaktion mit p - Nitrophenylphosphat bestimmt.

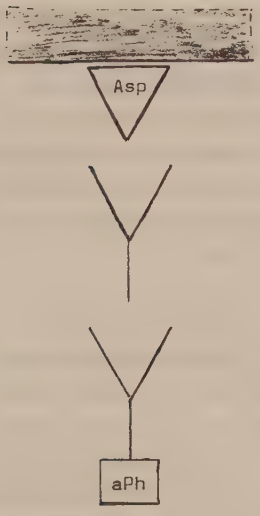


Fig. 4: Prinzip des ELISA - Tests zur Bestimmung von Antikörpern gegen l-Asparaginase

3.3. Durchführung des Tests

Zuerst wird eine standardisierte Menge l-Asparaginase (Crasnitin^{R}), die in Carbonat-Bicarbonat-Puffer gelöst ist, durch 16 stündige Inkubation bei 4°C an eine Mikrotiterplatte (Dynatech, Denkendorf) gebunden. In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte werden in diesem, wie auch in den folgenden Arbeitsschritten 0,2 ml pipettiert. Nach der Inkubationszeit wird die Platte dreimal mit PBS-Tween gewaschen.
Im zweiten Schritt werden die Proben (Patientenseren) auf die Platte gebracht; sie sind hierbei im Verhältnis 1:20 in PBS-BSA-EDTA verdünnt. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C werden die Platten erneut dreimal mit PBS-Tween gewaschen.
Nun wird der an alkalische Phosphatase konjugierte Anti-Human-IgG - bzw. IgM - Antikörper in PBS-Tween verdünnt (Verdünnung s.u.) auf die Mikrotiterplatte gegeben und zwei Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach nochmaligem dreifachen Waschen mit PBS-Tween wird das Substrat p-Nitrophenylphosphat in Diäthanolaminpuffer gelöst (1 mg PNPP auf 5 ml Diäthanolaminpuffer) zugegeben. Nach 30 Minuten Rektionszeit bei Raumtemperatur wird die optische Dichte bei 405 nm mit Hilfe eines automatischen ELISA Meßgerätes (Flow Laboratories, Bonn) bestimmt.

3.4. Auswertung

Als Vergleichspunkt wurde die optische Dichte eines eines gepoolten Normelserums benutzt (für alle Tests Aliqots des gleichen Serums).

$$\text{rel. Antikörperkonzentration (Titer)} = \frac{\text{o.D. 405 nm Patientenserum}}{\text{o.D. 405 nm Normalserum}}$$

Da sich inzwischen erwiesen hat, daß die gemessenen Extinktionen nicht linear mit der vorhandenen Antikörpermenge steigen, werden neuerdings Serienverdünnungen

eines bestimmten menschlichen Serums als Standard eingesetzt. Dieses Serum mit hohem Antikörpergehalt wurde von einem erwachsenen Patienten mit ALL 2 Wochen nach Asparaginase-behandlung gewonnen. Der relative Antikörpertiter wird dementsprechend ausgedrückt in % dieses Standards.
An den in dieser Arbeit wiedergegebenen Antikörpertitern nach dem älteren Verfahren und den daraus resultierenden Schlußfolgerungen ändert diese neue Form der Ausdruckweise nichts.

3.5. Standardisierung des alkalische Phosphatase - konjugierten Antikörpers:

Zu Beginn werden 100 ng/ml Human IgG (Cohn Fraktion II, Sigma, München), bzw. 200 ng/ml IgM Myelomprotein (Cappel, Cochranville, USA) in Carbonat-Bicarbonat-Puffer gelöst und durch 16 stündige Inkubation bei 4°C an eine Mikrotiter-platte gebunden. Nach dreimaligem Waschen der Platte mit PBS-Tween werden verschiedene Verdünnungen der alkalische Phosphatase - konjugierten Antikörper (Orion, Helsinki, Finnland; Verdünnungen von 1:100 bis 1:1000 in PBS-Tween) durch 2 stündige Inkubation bei Zimmertemperatur an die immobilisierten IgG- und IgM-Antikörper gebunden. Das weitere Vorgehen entspricht dem letzten Schritt der üblichen Durchführung des Test (s.o.).
Es wird diejenige Konjugatverdünnung weiterhin benutzt, deren o.D. 405 nm am nächsten bei 0,5 liegt.

3.6. Standardisierung der l-Asp Konzentrationen:

Es werden verschiedene Konzentrationen von l-Asparaginase (Crasnitin^{R}) zwischen 1 E/ml und 100 E/ml auf einer Mikrotiterplatte wie oben beschrieben inkubiert. Um die am besten geeignete Konzentration zu ermitteln, wird der Test für jede l-Asp-Konzentration mit Normalserum (= Minimalwert) und dem Serum eines Patienten mit mutmaßlich hohen Antikörpertitern durchgeführt. Die l-Asp-Konzentration wird weiterhin benutzt, bei der die Differenz zwischen Minimal - und Maximalwert am größten ist.

4. Komplementtechnologie

4.1. Bestimmung von C3, C4 und Faktor B:

Die Bestimmung dieser Komplementfaktoren erfolgte mittels radialer Immundiffusion (Mancini et al., 1965) auf kommerziell gefertigten Diffusionsplatten (Behring, Marburg). Die Auswertung wurde anhand von Standardkurven, die für C3 und C4 vom Hersteller geliefert werden und die für Faktor B durch die Verdünnung eines Proteinstandard - serums ermittelt werden, vorgenommen.

4.2. Elektrophoretische Methoden:

Reagentien:

a) EDTA-Barbiturat-Puffer: 18,96 g Na-Barbital, 2,73 g Barbitursäure und 1,49 g Di-Na-EDTA werden gemischt. Die Barbitursäure muß in heißem Aqua dest. gelöst werden, die übrigen Substanzen gehen bei Zimmertemperatur in Lösung. Der pH wird nach Abkühlen des Puffers auf 8,6 eingestellt.

b) Immunelektrophorese (IEP) - Puffer: 26,89 g Na-Barbital, 1,5 g Natriumazid und 1 N HCl werden bis zu einem pH von 8,6 in 3 l Aqua dest. gelöst.

c) Agar für die gekreuzte Immunelektrophorese und die Rocketelektrophorese: 1 g Agarose H (LKB) wird in Puffer a (100 ml) bis zur Klärung der Lösung erhitzt. Für die Rocketelektrophorese zur Bestimmung von C3d wird dem Agar 1 % Polyethylenglykol 6000 (Merck, Darmstadt) zugesetzt.

d) Agar für die Immunelektrophorese: 1 g Agarose H wird in 100 ml Puffer b durch Erhitzen gelöst.

e) Färbelösung: 5 g Coomassie Blue (Brilliantblau R 250, Merck, Darmstadt) werden in 1 l Entfärber gelöst.

f) Entfärbelösung: 100 ml Eisessig, 500 ml Methanol und 500 ml Aqua dest. werden gemischt.

g) Polyethylenglykol - Lösung: 48 g Polyethylenklykol 6000 werden in 100 ml Puffer a gelöst.

Rocketelektrophorese zur Bestimmung von C3d :

Die Rocketelektrophorese wird durchgeführt nach der Beschreibung von Laurell (Laurell, 1972).
3,5 ml Agar werden bis zur Aufklärung erhitzt; nach Einstellung dieses Agars auf eine Temperatur von 56°C werden 15 ul Anti-Human-C3d-Antikörper (Dako, Kopenhagen) zugegeben und gut vermischt. Dieses Gemisch wird anschließend auf eine 5 X 5 cm große Glasplatte gegossen. Mit einer Stanze (Durchmesser 3 mm, LKB) werden Löcher in den Agar gestanzt und mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt .
Da der Anti-C3d-Antikörper auch mit Determinanten von C3 und C3b kreuzreagiert, müssen diese Proteine zur Bestimmung von C3d aus dem Probenmaterial entfernt werden. Das geschieht, indem zu jeder Probe Lösung g im Verhältnis 1 : 3 (1 Teil PEG-Lösung zu 3 Teilen EDTA - Plasma) gegeben wird; nach 5 minütiger Zentrifugation mit einer Eppendorf - Tischzentrifuge wird der Überstand abgehoben und zur Analyse von C3d verwendet. Es werden 15 ul Probe eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Feldstärke von 2 V/cm über Nacht.
Die Auswertung der Proben erfolgt anhand einer Standardkurve. Diese Standardkurve wurde mithilfe eines C3d - Standards mit bekannten C3d Gehalt (angegben in mg/dl), der uns freundlicherweise von Herrn Dr. Sierstedt, Odense, Dänemark überlassen wurde, und dessen Verdünnungen ermittelt (Fig. 5).

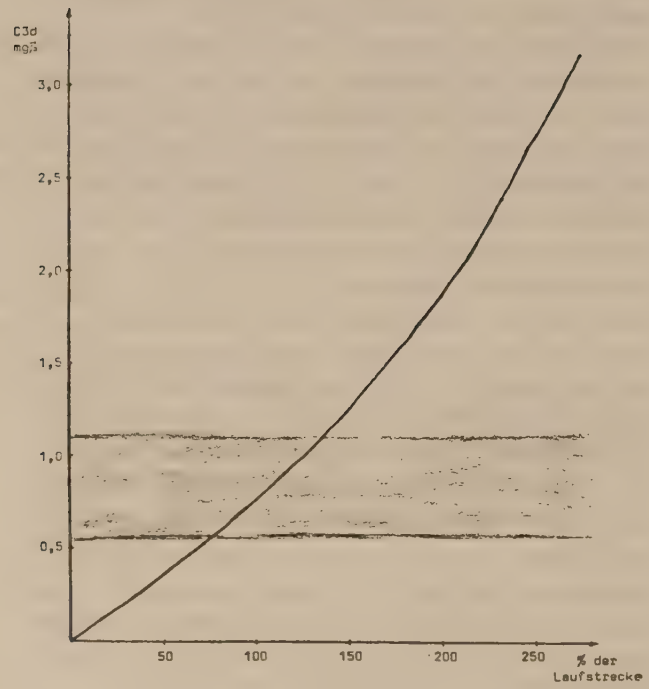


Fig. 5 :

C3d - Standardkurve

Der schraffierte Bereich gibt den Normbereich wieder. Die zur Auswertung der elektrophoretischen Bestimmung von C3d notwendige Standardkurve wird anhand eines Serums mit bekanntem C3d - Gehalt ermittelt.

Probleme bei der Messung von C3d in EDTA-Plasma:

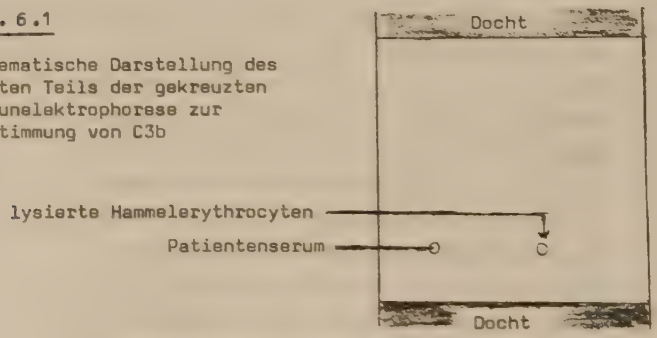
C3d ist ein relativ stabiles C3 - Spaltprodukt, das somit gut für den technischen Nachweis einer erfolgten C3 - Spaltung geeignet ist.
Da Serumproben nach längerem Stehen bei Zimmertemperatur eine spontane Spaltung von C3 zeigen können, hat die Verwendung von EDTA-Plasma den Vorteil, daß durch die Bindung zweiwertiger Kationen diese spontane Komplementaktivierung durch evtl. im Serum verhandene Aktivatoren verhindert werden kann.
In EDTA-Plasma bereitete die elektrophoretische Messung von C3d jedoch unerklärlicherweise Probleme derart, daß keine sichtbaren Präzipitate entstanden, was bei der Analyse der gleichen Proben mit der Benutzung von Serum durchaus der Fall war.
Zur Beseitigung dieses Mißstandes wurden folgende Experimente durchgeführt:
Da es durch die Verwendung von 1 % PEG im Agar zu einer besseren Präzipitatbildung kommen sollte, wurde dem für die gekreuzte Immunelektrophorese verwendeten Agar 1 % PEG zugesetzt. Allerdings konnte hierdurch allein das Problem nicht gelöst werden.
Deshalb versuchten wir gleichzeitig die Menge des zur Verfügung stehenden C3d zu erhöhen. Indem die Konzentration der dem EDTA-Plasma zugesetzten PEG-Lösung bis zur Grenze der Löslichkeit erhöht wurde, konnte die Menge von bereitstehendem C3d ca. verdreifacht werden (Vergleich: Zur Fällung von C3 und C3b in Serum ist 24 % PEG im Verhältnis 1 : 1 mit dem Serum gemischt ausreichend.).
Als letzte Maßnahme wurde schließlich der Proben - einsatz des Überstandes nach Zentrifugation von 5 ul, wie bei anderen Elektrophoresen üblich, auf 15 ul erhöht, wodurch nicht nur die Sichtbarkeit der Präzipitate verbessert werden konnte, sondern auch die Fehlerbreite der Analytik verringert wurde, da bei der Pipettierung größerer Mengen relativ kleinere Fehler entstehen.

Gekreuzte Immunelektrophorese zur Bestimmung von C3b :

Zuerst werden nach Erhitzen 3,5 ml flüssigen Agars (c) auf eine 5 x 5 cm große Glasplatte gegossen und an einer Seite zwei nebeneinander liegende Vertiefungen ausgestanzt (1,6 mm Durchmesser, LKB). In das randständige der Löcher wird das zu untersuchende Serum, in das andere Loch werden hämolysierte Hammel - erythrocyten als interner Marker für die erste Dimension pipettiert (Fig. 6.1.). Die so vorbereitete Platte wird in die Elektrophoresekammer gebracht und mit gut mit Puffer (a) getränkten Dochten verbunden. Die Auftrennung erfolgt in der Regel durch Anlegen einer Feldstärke von 10 V/cm; die Dauer dieses Vorganges beträgt gewöhnlich ca. 1,5 bis 2 Stunden und ist erkennbar an der Wanderungsstrecke des Hämoglobinmarkers (Soll: 2,5 cm).

Fig. 6.1

Schematische Darstellung des ersten Teils der gekreuzten Immunelektrophorese zur Bestimmung von C3b

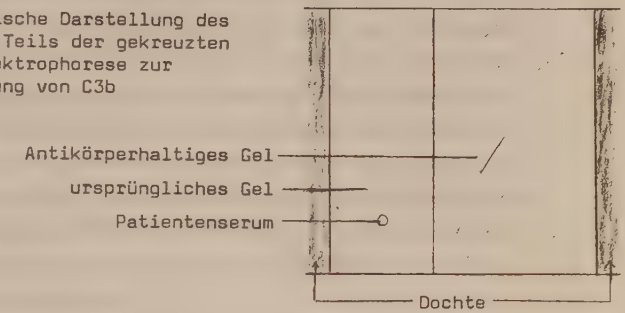


Nach der Entwicklung in der ersten Richtung wird die Platte aus der Kammer genommen und der eiweißfreie Teil oberhalb der Auftragsstelle mit einem Skalpell sorgfältig abgetrennt. Auf die so freigewordene Fläche wird Anti-C3-Antikörper haltiges Gel gegossen. Hierbei werden 2,8 ml Agarose auf eine Temperatur von 56°C eingestellt und mit 15 ul Anti-Human-C3-Antikörper (Cappel, Cochranville, USA) gemischt. Die verwendete Menge an Antikörper hängt natürlich vom Titer innerhalb des Präparates ab, liegt jedoch erfahrungsgemäß zwischen 15 und 2o ul. Nach dem Erstarren des Gels wird die Elektrophorese erneut

und zwar in der Richtung 90° zur ersten verschoben gestartet. Mit einer Felstärke von 2 V/cm bei 4°C und über ca. 18 Stunden werden die Eiweiße so in das Antikörperhaltige Gel transportiert (Fig. 6.2.).

Fig. 6.2

Schematische Darstellung des zweiten Teils der gekreuzten Immunelektrophorese zur Bestimmung von C3b

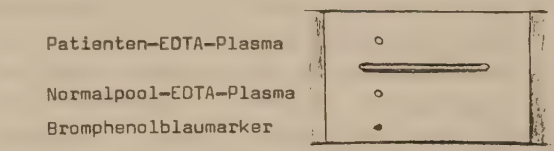


Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Platten dann dreimal mit 0,1 M NaCl und einmal mit Aqua dest. für jeweils 10 Minuten gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschvorgängen werden sie jeweils ebenfalls 10 Minuten lang zwischen Filterpapier getrocknet. Nach dem letzten Trockenvorgang läßt man die Platten vollständig an der Luft trocknen.
Das Präzipitat wird angefärbt in Färbelösung (e) für ca. 10 Minuten und entfärbt in Entfärbelösung (f) für gleichfalls 1o Minuten. Gegebenenfalls muß zweiteres noch einmal wiederholt werden. Nach dem Trocknen an der Luft können die Platten dann ausgewertet werden. Die Auswertung der Proben erfolgt semiquantitativ, indem die Peakhöhe des C3 und C3b Peaks verglichen werden.

Immunelektrophorese zur Analyse von Faktor B Spaltprodukten :

Auf eine 5 x 7,5 cm große Glasplatte werden 5 ml des erhitzten Agars für die Immunelektrophorese (d) gegossen. In Längsrichtung der Platte wird mit einem Skalpell in der Mittellinie der Platte ein schmaler Streifen ausgehoben und symetrisch auf jede Seite davon jeweils ein Loch gestanzt (1,6 mm Durchmesser, LKB, Fig. 7.1.) In eines der Löcher werden 5 ul Normalpool-EDTA-Plasma, in das andere 5 ul des zu untersuchenden Patienten-EDTA-Plasmas pipettiert. In gleicher Höhe wird ein kleiner Markierungspunkt mit Bromphenolblau (1 % ig in H_2O) aufgetragen.

Fig. 7.1



Die Glasplatte wird dann in die Elektrophoresekammer, die mit Immunelektrophoresepuffer (b) gefüllt ist, gebracht und mit den Dochten in Längsrichtung verbunden. Die Trennung der Eiweiße erfolgt bei einer Feldstärke von 1,8 V/cm solange, bis der Bromphenolblaumarker bis an das Ende des Gels gewandert ist, was in der Regel ca. 2 h dauert.
Nach Beendigung dieses Vorgangs wird in den ausgehobenen Mittelstreifen Kaninchen-Anti-Human-Faktor B (Behring, Marburg) in geeigneter Verdünnung gegeben. Die Platte wird schließlich über Nacht, mindestens 18 h, in einer feuchten Kammer belassen, damit sich ein Präzipitat ausbilden kann.
Nach den unten beschriebenen Wasch-, Trocken- und Färbevorgängen erfolgt die Auswertung zum Schluß durch den Vergleich zwischen Patienten- und Normal-EDTA-Plasma - Präzipitat qualitativ (Fig. 7.2.).

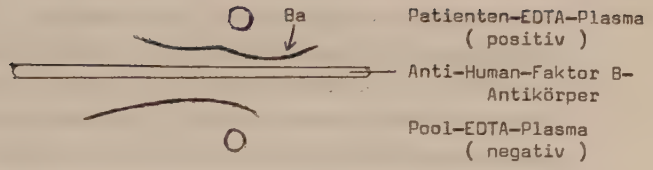


Fig. 7.2 : Spaltprodukte von Faktor B (Skizze)

Die Ermittlung der geeigneten Verdünnung des Anti-Human-Faktor B-Antikörpers erfolgt anhand verschiedener Verdünnungsstufen bei Gebrauch eines Zymosan - aktivierten Serums, also eines Serums, das eine sichere Aktivierung des alternativen Komplementweges und damit Faktor B Spaltprodukte aufweist.
Dieses Serum wird folgendermaßen hergestellt:
Zu 5 mg Zymosan wird im Überschuß o,9 %iges NaCl gegeben. Das Genze wird 30 Minuten bei 100°C in einem Glasröhrschen gekocht. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 3000 U/min und Dekantierung des Überstandes gibt man 0,5 ml gepooltes Normalserum zum Bodensatz. Durch 30 minütige Inkubation bei 37°C kommt es zur Aktivierung des alternativen Komplementweges.

Wasch- und Färbevorgang der C3d - Rocket - und der Immunelektrophoresen:

Da für diese beiden beschriebenen Elektrophoresearten Wasch - und Färbevorgänge identisch sind, sollen sie an dieser Stelle gemeinsam beschrieben werden. Zuerst werden die Elektrophoreseplatten 20 Minuten in 0,9 % iger NaCl-Lösung gewaschen. Nach einem 15 minütigem Trockenvorgang zwischen Filterpapier werden sie erneut für 20 Minuten in physiologische Kochsalz - lösung und anschließend direkt 2o Minuten lang in Aqua dest. gelegt. Hiernach werden sie wieder zwischen Filterpapier und schließlich an der Luft getrocknet, bis das Gel klar ist.

Das Anfärben erfolgt für 15 bis 20 Minuten in Färbelösung (e); entfärbt wird in Entfärbelösung (f) solange, bis der Hintergrund keine Blaufärbung mehr zeigt. Die Platten werden zu guter Letzt an der Luft getrocknet und können dann ausgewertet werden.

4.3. Hämolytische Komplementtitration

4.3.1. Bestimmung der gesamthämolytischen Aktivität des klassischen Komplementweges

Reagentien:

VBS-Stammlösung:

a) 2,875 g Barbitursäure und 1,275 g Na-Barbiturat werden mit Aqua dest. bis auf 250 ml gebracht.

b) 42,5 g NaCl, 0,68 g $MgSO_4 \times 7\ H_2O$ und 5 ml 0,15 M $CaCl_2$-Lösung werden in Aqua dest. bis zu einer Gesamtmenge von 250 ml gelöst.

Die Lösungen a) und b) werden gemischt und mit Aqua dest. bis auf 1000 ml aufgefüllt.

VBS-Gelantine Puffer:

40 ml VBS-Stammlösung und 160 ml Aqua dest. werden gemischt. Davon werden 10 ml abgehoben und mit 200 mg Gelantine (Serva, Heidelberg) bis zur Auflösung derselben erhitzt. Diese Gemisch wird danach wieder der eigentlichen Lösung zugesetzt.

EDTA-Stammlösung (0,1 m):

18,6 g Titriplex III und 2,91 ml 32 %ige NaOH werden mit Aqua dest. auf 500 ml gebracht.

EDTA-Puffer:

10 ml 0,1 m EDTA-Stammlösung werden mit 90 ml VBS-Gelantine-Puffer gemischt.

Herstellung der Hammelerythrocyten für den Testansatz:

Zur Auswaschung hämolytischer Erythrocyten werden die Hammelerythrocyten (Behring, Marburg) mindestens 4 mal mit VBS-Gelantine Puffer gewaschen. Hierzu wird genügend Puffer zu 20 ml Erythrocytenlösung in

ein Zentrifugenröhrchen (Falcon, Div. Becton, Dickinson & Co., Ca. 93o3o USA) gegeben und solange gemischt, bis keine Erythrocyten mehr an den Wandungen des Röhrchens kleben. Danach erfolgt die Zentrifugation bei 700 g und 4°C für 15 Minuten; der Überstand wird dekantiert und der Waschvorgang beginnt von vorne. Wenn der Überstand farblos ist, was gewöhnlich nach viermaligem Waschen der Fall ist, werden nach dem Dekantieren die Erythrocyten in gleicher Art und Weise zweimal mit EDTA-Puffer gewaschen. Nach Beendigung auch dieser Waschvorgänge werden die Hammelerythrocyten in der doppelten Menge der Ausgangslösung, d.h. bei einer Ausgangsmenge von 20 ml Erythrocyten in 40 ml, EDTA-Puffer aufgenommen.
Zur weiteren Benutzung muß eine Einstellung der Hammelerythrocytenlösung auf 10^9 Erythrocyten/ml erfolgen. Um das zu erreichen, wird die Extinktion bei 541 nm einer Mischung aus 0,5 ml Erythrocytenlösung und 7 ml Aqua dest. gemessen. Erfahrungsgemäß liegt diese Extinktion bei Vorliegen der gewünschten Erythrocytenkonzentration bei 0,75. Zeigt die hergestellte Lösung eine niedrigere Extinktion, so wird nach folgender Formel EDTA-Puffer ergänzt:

$$\text{Zuzugebendes Vol.} = \frac{\text{Vorhandenes Vol.} \times (\text{Extinktion} - 0{,}75)}{0{,}75}$$

Nach Ergänzung des errechneten Volumens, wird der Gehalt der Lösung an Erythrocyten erneut kontrolliert und gegebenenfalls nachkorrigiert.

Amboceptortitration:

Für jede neue Charge Hammelerythrocyten (HAE) muß jeweils eine Amboceptortitration durchgeführt werden. Zunächst wird der Amboceptor (Hämolysin, Behring, Marburg) in Verdünnungsstufen von 1:50 bis 1:1000 in EDTA-Puffer gelöst. 1 ml jeder Verdünnungsstufe und 1 ml der vorher hergestellten Hammelerythrocyten (s.o.) werden gemischt und 20 Minuten lang bei 37°C

im Schüttelbad inkubiert. Anschließend werden die Erythrocyten mit dem nunmehr angelagerten Amboceptor (= HAEA) dreimal wie oben beschrieben mit VBS-Gelatine-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang werden die HAEA jeweils in 2 ml VBS-Gelatine-Puffer aufgenommen. Von jeder Verdünnungsstufe wird folgender Ansatz gemacht:

0,5 ml HAEA
+ 1 ml gepooltes Normalserum, 1:50 in VBS-Gelatine-Puffer verdünnt.

Kontrollansatz:

0,5 ml HAEA
+ 1 ml VBS-Gelatine-Puffer.

Alle Ansätze werden 20 Minuten bei 37°C im Schüttelbad inkubiert, anschließend 15 Minuten bei 7oo g und 4°C zentrifugiert. Nach Bestimmung der Hämolyserate jedes Ansatzes bei 541 nm wird diejenige Amboceptorverdünnung weiterhin benutzt, bei der die Differenz zwischen Kontrollansatz und Probe am größten ist.

Anlagerung des Amboceptors an die Hammelerythrocyten :

Den oben hergestellten Hammelerythrocyten (HAE), die in EDTA-Puffer auf $1o^9$ Erythrocyten/ml eingestellt sind, wird das gleiche Volumen des entsprechend verdünnten Amboceptors (Verdünnung in der Regel bei ca. 1:4oo bis 1:6oo) zugegeben; das Ganze wird 20 Minuten bei 37°C im Schüttelbad inkubiert.
Durch die Gegenwart des EDTAs ist gewährleistet, daß es nicht durch im Hämolysin enthaltene Komplementfaktoren zur Lyse der Hammelerythrocyten kommen kann, was die Messung der durch menschliche Komplementfaktoren bedingten Hämolyse verfälschen würde.
Nach der Inkubation wird die Erythrocytenlösung mit nun angelagertem Amboceptor (= HAEA) dreimal wie oben beschrieben in VBS-Gelatine-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang wird vorläufig VBS-Gelatine-Puffer in einem Volumen, das der HAE-Ausgangsmenge entspricht, zugegeben.

Für den Testansatz wird eine Zellkonzentration von 5×10^8 HAEA/ml benötigt. Bei der Kontrolle durch die Messung der Extinktion bei 541 nm , die durch die Lyse von 0,5 ml HAEA in 7 ml Aqua dest. erreicht wird, sollte diese 0,375 betragen. Eine gegebenenfalls nötige Volumenkorrektur wird nach der oben genannten Formel (wobei 0,75 jeweils ersetzt wird durch 0,375) vorgenommen.

Testdurchführung :

- Patientenserum in mehreren Stufen von 1 : 40 bis 1 : 240 verdünnen (am günstigsten ist die Verdünnung in zwei Serien von 1 : 40, 1 : 80, 1 : 160 und 1 : 60, 1 : 120 und 1 : 240.).
- In jedes Röhrchen wird 1 ml des so verschieden verdünnten Serums gebracht.
- Dazu wird jeweils 1 ml HAEA gegeben.
- Dieser Ansatz wird 60 Minuten bei 37°C im Schüttelbad inkubiert.
- Anschließend wird das Gemisch 10 Minuten lang bei 4°C und 700 g zentrifugiert.
- Die Extinktion des Überstandes wird bei 541 nm gemessen.

Bei jeder Meßreihe sind folgende Kontrollen durchzuführen:

Totallyse: 0,5 ml HAEA + 7 ml Aqua dest.

Nullyse: 0,5 ml HAEA + 7 ml Aqua dest.

Die Auswertung erfolgt dann auf semilogarithmischem Papier. Entsprechend der Krogh'schen Gleichung liefern die gemessenen Extinktionen eine sigmoide Kurve, die sich sowohl der Geraden der 0 % Lyse als auch der der 100 % Lyse annähert. Die 50 % Lyse ergibt sich dann folgender folgendermaßen:

$$\text{o.D. 50 \% Lyse} = \frac{\text{o.D. 100 \% Lyse} + \text{o.D. 0 \% Lyse}}{2}$$

Der reziproke Wert derjenigen Serumverdünnung, bei der die Gerade der 50 % Lyse die sigmoide Kurve schneidet, liefert den Titer für das betreffende Serum.(= CH 50). Um das Ergebnis unabhängig von den möglicherweise variierenden äußeren Versuchsbedingungen zu machen, wird üblicherweise ein gepooltes Normalserum, das wie oben beschrieben behandelt wird, mitgeführt. Das endgültige Ergebnis wird dann angegeben in % des Normalserums.

Normbereich: 75 - 120 % der Norm

4.3.2. Bestimmung der gesamthämolytischen Aktivität des alternativen Komplementweges (AP 50)

Reagentien:

0,1 M EGTA-Stammlösung:

3,8 g Ethylenglykoltetraessigsäure werden in 40 ml Aqua dest. gelöst. Mit 10 N NaOH wird der pH Wert auf 7,4 bis 7,6 eingestellt. EGTA beginnt erst ab einem pH Wert von 7,0 in Lösung zu gehen. Dann wird das Volumen mit Aqua dest. bis auf 100 ml aufgefüllt. Für die Durchführung des Testes darf der pH Wert nicht unter 7,2 abfallen.

Veronal-Stammlösung:

629,16 g NaCl (44,94 g/l),
18,9 g $NaHCO_3$ (1,35 g/l),
22,5 g Na-Barbital (1,61 g/l)

lösen in 14 l kaltem Aqua dest., mischen mit 34,5 g Barbitursäure, die zuvor in 1 l heißem Wasser gelöst wurde. Der pH soll zwischen 7,4 und 7,6 betragen.

$gvb^{=}$ (Gelatine-Veronal-Puffer ohne Metallzusatz):

1 g Gelatine (Serva, Heidelberg) wird heiß in 200 ml Veronalstammlösung gelöst. Danach wird Aqua dest. bis zu einem Gesamtvolumen von 1 l zugefügt.

$MgCl_2$-Lösung:

20,3 g $MgCl_2 \times 6\ H_2O$ werden in 100 ml Aqua dest. gelöst und bei $4^{\circ}C$ gelagert.

gvb^{+}-EGTA :

90 ml $gvb^{=}$, 10 ml EGTA-Stammlösung und 0,25 ml 2 M $MgCl_2$ werden durch gutes Mischen gelöst. Diese Lösung muß jeden Tag frisch angesetzt werden.

Normal-Kochsalz-Lösung :

175,5 g NaCl werden in 20 l H_2O (8,78 g/l) gelöst, was einer 0,15 M Lösung entspricht.

$ggvb^{++}$(Glukose-Gelatine-Veronal-Puffer mit Metallzusatz) :

25 g Glukose-Monohydrat und 0,5 g Gelatine werden in 200 ml Aqua dest. unter Erhitzen gelöst; dann werden 100 ml Veronal-Stammlösung und 1 ml 2 M $MgCl_2$ werden zugegeben und alles mit Aqua dest. bis auf 1 l ergänzt.

Gewinnung der Kaninchenerythrocyten:

Durch die Punktion einer Ohrvene wird von Kaninchen (in unserem Fall von der Kaninchenrasse weiße Neusee - länder) Blut gewonnen, das mit Na-Citrat 1 : 10 verdünnt wird. Die Erythrocyten werden mehrmals in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen (Bedingungen wie bei den unter 4.3.1. beschriebenen Waschvorgängen). Anschließend werden sie mit $ggvb^{++}$ solange gewaschen, bis der Überstand nach Zentrifugation klar ist. Danach werden die Erythrocyten auf eine Konzentration von 1×10^9 Zellen eingestellt, wie ebenfalls unter 4.3.1. beschrieben.

Für den Testansatz werden die Zellen mindestens dreimal in gvb^{+}-EGTA gewaschen und auf 10^8 Erys/ml (s.o.) eingestellt.

Testdurchführung:

- 0,1 ml Serum und 0,1 ml gvb^{+}-EGTA werden gemischt.
- Von diesem Ausgangsgemisch werden Serienverdünnungen in gvb^{+}-EGTA von 1 : 2 bis 1 : 32 hergestellt, so daß in jedem Röhrchen 0,1 ml der Serienverdünnung verbleiben.

- Zu jeder Verdünnungsstufe werden 0,1 ml Kaninchenerythrocyten in einer Konzentration von 10^8 Erys/ml gvb^+-EGTA gegeben.
- 0,1 ml gvb^+-EGTA werden in jedes Röhrchen pipettiert.
- Nach gutem Mischen werden die Ansätze unter gelegentlichem Schütteln 15 Minuten bei Zimmertemperatur belassen.
- Dann erfolgt eine 60 minütige Inkubation bei 37°C im Schüttelbad.
- Jedem Ansatz werden 2 ml Normalsalzlösung zugegeben.
- Es folgt eine 5 minütige Zentrifugation bei 4°C und und 2000 U/min.
- Vom Überstand wird die Extinktion bei 412 nm bestimmt.

Für jede Meßreihe müssen folgende Kontrollansätze erfolgen:

Totallyse : 0,1 ml Kaninchenerythrocyten + 2,2 ml H_2O

Nullyse : 0,1 ml Kaninchenerythrocyten + 2,2 ml gvb^+-EGTA

Die Probenauswertung entspricht derjenigen für die Titration des gesamthämolytischen Komplementes des Klassischen Weges (s.o.).

5. In vitro Experimente

5.1. Herstellung spezifischer IgG-Anti-l-Asp-Antikörper

Die zur Bildung der Antikörper vorgesehenen Kaninchen werden zuerst 6 mal im Abstand von je einer Woche mit einer Suspension aus l-Asp (Crasnitin, 5 mg Trockensubstanz in 1 ml 0,9 % iger NaCl) und Freundschem Adjuvans (Behring; beim ersten Mal komplettes F.A., dann nur noch inkomplettes F.A.), im Verhältnis 1 : 1 gemischt, an vier verschiedenen Körperstellen mit jeweils der gleichen Menge des Gemisches geimpft. Die erste Immunisierung erfolgt intramuskulär, die fünf Boosterungen werden subcutan durchgeführt. Eine Woche nach der letzten Impfung werden die Kaninchen durch Herzpunktion entblutet.

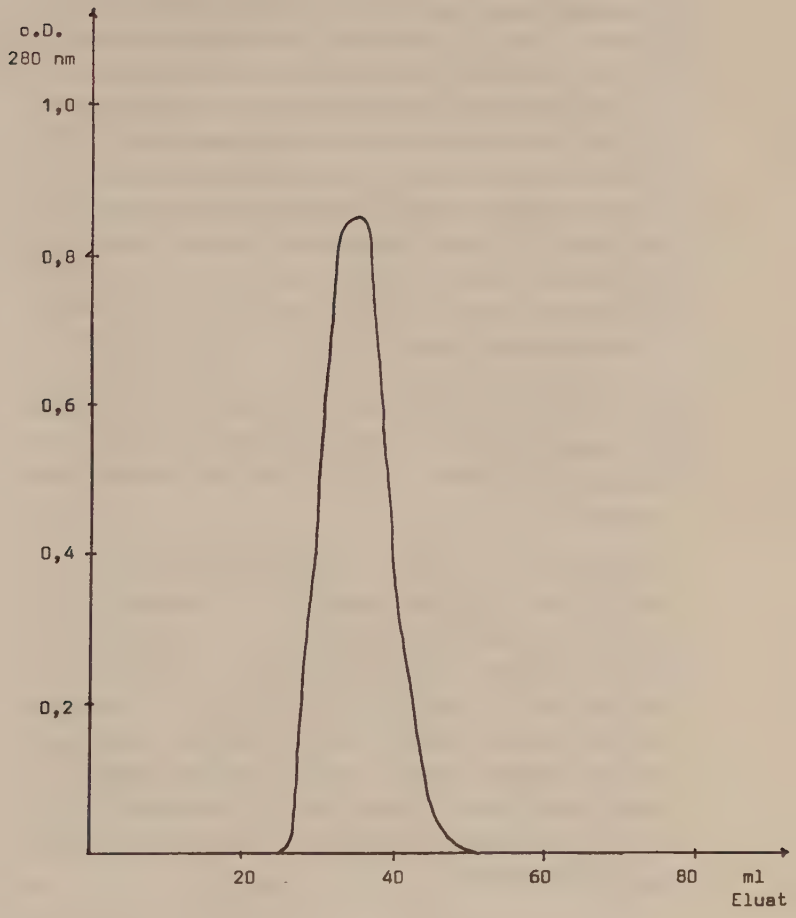


Fig. 8 :

Elutionsprofil der IgG - Fraktion des experimentellen Kaninchen-Anti-l-Asp-Antikörpers auf einer DEA 52 - Säule

Die IgG - Fraktion befindet sich zwischen 20 und 40 ml des Eluats (entspricht den Fraktionen Nr. 20 - 40) als einzelner Peak.

Zur Herstellung der IgG-Antikörper werden 10 ml Antiserum (aus dem Kaninchenblut gewonnen) eisgekühlt mit 5 ml gesättigter und ebenfalls eiskalter Ammoniumsulfatlösung tropfenweise versetzt und 30 Minuten bei $0^{o}C$ unter ständigem Rühren inkubiert. Anschließend werden die Nichtglobuline durch 15 minütige Zentrifugation bei $4^{o}C$ und 2000 g entfernt. Der Überstand wird dekantiert und das entstandene Präzipitat wird in PBS gelöst.
Die Lösung wird dann über Nacht gegen 0,07 M Phosphatpuffer dialysiert (s.u.).

0,07 M Phosphatpuffer :

200 ml 0,07 M Na_2HPO_4 und 800 ml NaH_2PO_4 (0,07 M) werden zusammengegeben, so daß ein pH Wert von 6,3 resultiert.

Am nächsten Morgen wird das Dialysat auf eine DEA 52 - Säule (Länge 75 cm, Durchmesser 1,6 cm) gegeben und mit einer Geschwindigkeit von 60 ml/h in 1 ml Fraktionen eluiert. Zwischen 20 und 40 ml des Eluats befindet sich die IgG Fraktion (Fig. 8). Die Fraktionen, die - wie durch das Elutionsprofil erkennbar - IgG enthalten, werden gepoolt.(ca. 20 - 25 Fraktionen). Zur weiteren Handhabung werden sie mittels Ultra - filtration (Amikon, Membran 10 YM 30, 25 mm Durchmesser) auf 10 ml eingeengt.

5.2. Nachweis der Reinheit der l-Asparaginase :

Zu diesem Zweck wurde l-Asparaginase immunelektrophoretisch in einer Konzentration von jeweils 100, 500 und 1000 E/ml über 1 - 3 Stunden mit einer Feldstärke von 2 V/cm aufgetrennt. Das l-Asp-Antiserum wurde 1 : 1 bis 1 : 16 verdünnt. Das weitere Procedere ist oben beschrieben.

5.3. Kreuzreaktivität zwischen E.coli - und Erwinia - l-Asparaginase

Diese Untersuchung wurde einerseits durchgeführt anhand eines Patientenserums, in dem zuvor hohe Antikörpertiter gemessen worden waren, und andererseits anhand des experimentell hergestellten Kaninchenantiserums.
Zum Nachweis der Kreuzreaktivität zwischen E.coli - und Erwinia - l-Asp in Verbindung mit menschlichem Serum wurde die entsprechende l-Asp jeweils in einer Konzentration von 0,1 mg/ml in Carbonat- Bicarbonat-Puffer (s.o.) verdünnt und über Nacht bei $4^{o}C$ auf einer Mikrotiterplatte (0,2 ml/Vertiefung) inkubiert. Anschließend wurde der ELISA - l-Asp - Antikörpertest wie oben beschrieben unter Zuhilfenahme des antikörperhaltigen Patientenserums durchgeführt. Die sich ergebenden Titer wurden dann verglichen.
Im zweiten Fall wurde vergleichend die Reaktion des aus Kaninchenserum experimentell gewonnenen und gereinigten Anti-l-Asp IgG-Antiserums mit E.coli - und Erwinia - l-Asp mittels Ouchterlony - Diffusion bestimmt. Hierbei wurden l-Asp-Konzentrationen zwischen 100 und 1000 E/ml und Antikörperproteinkonzentrationen in Verdünnungen von 1:1 bis 1:32, ausgehend von einer Ursprungskonzentration von 550 mg/ml, über Nacht bei Raumtemperatur gegeneinander eingesetzt (Agar: 1,5 Agar purum, Behring, in Glycin-Kochsalz-Puffer).

6. Statistische Auswertung

Soweit eine statistische Auswertung der Daten vorgenommen wurde, erfolgte sie nach dem Zweistichproben - t - Test.

IV. Resultate

1. Klinische Daten

Eine Zusammenfassung der klinischen Daten der in dieser Studie untersuchten Patienten wird in Tab. 2 gegeben. Insgesamt wurden 97 Infusionen mit l-Asparaginase bei 24 Patienten untersucht. Patienten, die nach der Pilot COALL 82 - Studie behandelt wurden, erhielten sowohl in der Induktions- wie auch in der Reinduktionsphase jeweils einen l-Asp - Kurs, bestehend aus 4 x 3000 E/kg KG l-Asp im Abstand von je drei Tage. Patienten, die nach dem endgültigen COALL 82 - Protokoll behandelt wurden, wurde nur in der Induktionsphase l-Asparaginase verabreicht. Das Alter der untersuchten Kinder lag zwischen 3 und 17 Jahren (Median: 6 Jahre); das Geschlechtsverhältnis betrug 11 männliche zu 13 weiblichen Patienten.
13 Patienten wurden als high risk Patienten eingestuft. Die Einteilung ist im COALL Protokoll festgehalten, wobei Patienten, die an einer anderen Leukämieform als der cALL oder an einer cALL mit initial mehr als 25000 Leukocyten/ mm^3 erkrankt waren, der high risk - Gruppe zuzuordnen sind. In diesem Fall ist eine Schädelbestrahlung zusätzlich zum festgelegten Protokoll obligatorisch.

In der folgenden Tabelle sind die klinischen Symptome der Patienten mit erlittenen allergischen Reaktionen noch einmal hervorgehoben (Tab. 3):

Patient	Symptome
A., J.	Flush, Pruritus, Erbrechen, Kopfschmerzen
B., S.	Schweißausbruch, Kollaps
B., T.	Flush, Kollaps
G., G.	Flush, Pruritus, Erbrechen
K., R.	Flush, Erbrechen
N., M.	Flush, Pruritus, Erbrechen
S., A.	Flush, Erbrechen, Tachykardie, Hypotonie
Z., A.	Flush, Erbrechen, Bauchschmerzen, Tachykardie, Kollaps

Tab. 3 : Symptome bei Patienten mit allergischen Reaktionen

Tab. 2 : Klinische Daten der mit Asparaginase behandelten Patienten, Seite 1

Patient	Alter	Geschlecht	Diagnose; Risikogruppe	Therapieschema	Beobachtungsperiode	Bemerkungen
A., Y.	8 J.	weiblich	c-ALL; high risk	Pilot COALL 82	Reinduktion	
A., J.	6 J.	weiblich	NHL; high risk	Pilot COALL 82	Induktion und Reinduktion	allergische Reaktion bei Inf. 1 der Reindukt. (Übelkeit, Brechreiz, Juckreiz, Flush)
B., T.	5 J.	weiblich	c-ALL; low risk	Pilot COALL 82	Induktion und Reinduktion	allergische Reaktion bei Inf. 1 der Reindukt. (Kollaps, Flush)
B., M.	11 J.	männlich	c-ALL; low risk	COALL 82	Induktion	
B., D.	6 J.	weiblich	ALL; high risk	COALL 82	Induktion	
B., S.	13 J.	weiblich	ALL; 1. Rezidiv	COALL 82	Induktion	allergische Reaktion bei Infusion 4 (Schweißausbruch, Kollaps)
D., V.	4 J.	weiblich	ALL; low risk	COALL 82	Induktion	
D., S.	6 J.	weiblich	ALL; low risk	Pilot COALL 82	Induktion und Reinduktion	
D., D.	3 J.	männlich	ALL; high risk	COALL 82	Induktion	
G., G.	5 J.	männlich	ALL; high risk	Pilot COALL 82	Induktion	allergische Reaktion bei Infusion 4 (Flush, Erbrechen, Juckreiz)
K., R.	15 J.	männlich	c/t ALL; high risk	Pilot COALL 82	Induktion und Reinduktion	allergische Reaktion bei Inf. 1 der Reindukt. (Flush, Erbrechen)

Tab. 2 : Seite 2

Patient	Alter	Geschlecht	Diagnose; Risikogruppe	Therapieschema	Beobachtungsperiode	Bemerkungen
N., O.	3 J.	männlich	c-ALL; low risk	Pilot COALL 82	Reinduktion	
N., M.	6 J.	männlich	ALL; high risk	Pilot COALL 82	Induktion und Reinduktion	allergische Reaktion bei Inf. 4 der Induktion (Flush, Juckreiz, Erbrechen)
R., M.	5 J.	männlich	ALL; high risk	COALL 82	Induktion	
R., F.	17 J.	männlich	ALL; low risk	Pilot COALL 82	Induktion und Reinduktion	
R., T.	9 J.	weiblich	c-ALL; low risk	Pilot COALL 82	Reinduktion	
R., L.	6 J.	weiblich	c-ALL; low risk	Pilot COALL 82	Reinduktion	
S., J.	8 J.	weiblich	ALL; high risk	COALL 82	Induktion	
S., A.	15 J.	männlich	NHL/c-ALL; high risk	COALL 82	Induktion	allergische Reaktion bei Infusion 4 (Flush, Erbrechen, Kollaps)
S., B.	4 J.	weiblich	c-ALL; low risk	COALL 82	Induktion	
S., M.	11 J.	weiblich	ALL; high risk	Pilot COALL 82	Reinduktion	
S., G.	9 J.	männlich	c-ALL; low risk	COALL 82	Induktion	
T., K.	4 J.	männlich	c/t-ALL; high risk	Pilot COALL 82	Reinduktion	
Z., A.	4 J.	weiblich	c-ALL; high risk	Pilot COALL 82	Reinduktion	allergische Reaktion bei Infusion 1 (Flush, Erbrechen, Bauchschmerzen, Kollaps)

Die allergischen Reaktionen traten fünfmal während der 4. Infusion der Induktionsbehandlung und dreimal bei der 1. Infusion der Reinduktionstherapie auf. Sobald bei einem Patienten allergische Symptome registriert wurden, wurde die l-Asp - Infusion abgebrochen. Mit einer Ausnahme entwickelten sich die hypersensitiven Symptome innerhalb der ersten 5 bis 10 Minuten der l-Asp - Infusionen. Nur in zwei Fällen (Patient B., S. und Z., A.) waren die Reaktionen schwer und mit einem Kreislaufzusammenbruch verbunden.
In den Fällen, bei denen allergische Reaktionen manifest wurden, erfolgte die weitere Therapie unter Verwendung von Erwinia - l-Asparaginase. Hierbei wurden keine Zwischenfälle mehr beobachtet.

2. Prüfung der Reinheit der Asparaginase

Um auszuschließen, daß das verwendete l-Asp - Präparat (Crasnitin^{R}, Bayer) mit Begleitproteinen verunreinigt ist, wurde die Reinheit des Präparates mittels Immunelektrophorese und Gelfiltration geprüft.

Bei der Durchführung der Immunelektrophorese wurde wie oben beschrieben die Laufzeit und Verdünnung des Antikörpers variiert, um auch niedrige Proteinkonzentration erfassen zu können. Jedoch auch unter diesen optimalen Bedingungen konnte nur eine Präzipitat - Bande im Präparat nachgewiesen werden (Fig. 9).

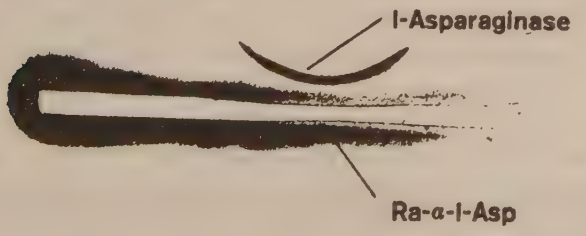


Fig. 9 : Immunelektrophorese von l-Asparaginase gegen spezifisches Kaninchenantiserum (Ra-α-l-Asp)

Zur weiteren Absicherung dieses immunochemischen Ergebnisses wurde dann l-Asparaginase gelchromatographisch in einer mit Sephadex G 200 bepackten Säule aufgetrennt. Das Elutionsprofil zeigte nur einen deutlichen Peak, in dessen fraktionierten Material die l-Asparaginase wiederzufinden war (Fig. 10).
Schlußfolgernd kann man davon ausgehen, das das unseren Patienten verabreichte Präparat einen hohen Reinheitsgrad aufweist und demnach erhobene Befunde dem Enzym l-Asp zuzuordnen sind.

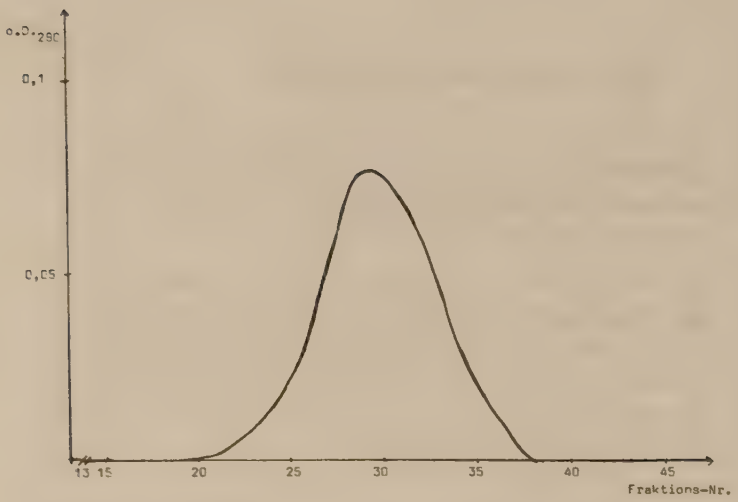


Fig. 10 :

Elutionsprofil der l-Asparaginase auf einer Sephadex G 200 Säule

Das Elutionsprofil zeigt als Beleg der Reinheit der l-Asp nur einen einzelnen Peak zwischen 20 und 40 ml des Eluats.

3. Verhalten spezifischer Antikörper gegen l-Asparaginase

In Fig. 11 ist die Entwicklung der spezifischen IgG - Antikörper gegen l-Asp im Verlauf der Therapie bei allen untersuchten Patienten dargestellt.
Die Resultate für die 2. bis 4. Infusion der Reinduktionsphase werden nicht wiedergegeben, da nur wenige Patienten während dieser Infusionen beobachtet werden konnten und so weitergehende Aussagen aus den vorhandenen Daten nicht möglich sind.
Die Mediane der Anti-l-Asp-IgG-Antikörper sind bei den ersten drei Infusionen der Induktionsphase im Normbereich angesiedelt. Signifikante Veränderungen von den Prä - zu den Post - Infusionsmedianen sind während dieser Infusionen nicht feststellbar. Eine deutliche Zunahme der Mediane für die Titer prä infusionem ist sowohl von der 2. zur 3. Infusion - sich jedoch noch im Normbereich bewegend - als auch von der 3. zur 4. Infusion zu registrieren. Vor der vierten Infusion sind die Antikörpertiter im Median deutlich erhöht und nehmen unter der Infusion beträchtlich ab. Ein ähnliches Bild bieten die Antikörpertiter der 1. Infusion der Reinduktion.
Nach Patienten aufgechlüsselt ergibt sich folgendes Bild (Die Patienten - bezogene Entwicklung der Antikörpertiter ist hier nicht wiedergegeben.):
Bei den Patienten ohne allergische Reaktionen kam es in 10 von 16 Fällen zu einem kontinuierlichen Anstieg der Antikörpertiter. Zwei Patienten zeigten nur unwesentliche Veränderungen, zwei weitere hatten schon vor der ersten Infusion mäßig erhöhte Titer und bei den übrigen beiden Patienten konnten die Tests aufgrund fehlender Serummengen nicht durchgeführt werden.
Bei den Patienten, die allergische Reaktionen erlitten hatten, waren in 7 von insgesamt 8 Fällen für die jeweiligen Infusionen erhöhte Antikörpertiter prä infusionem nachweisbar, die unter l-Asp - Gabe regelmäßig abnahmen. Nur in einem Fall waren nur die IgM - nicht die IgG - Titer erhöht.

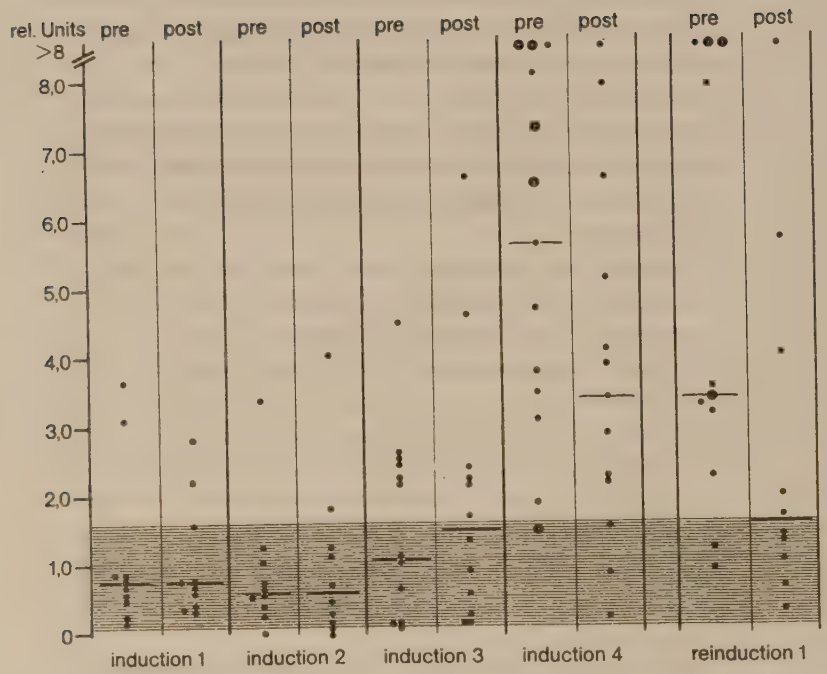


Fig. 11 :

Entwicklung der spezifischen IgG - Antikörper gegen l-Asparaginase im Verlauf der Therapie

Wiedergegeben sind Einzelwerte und Mediane (waagerechte Balken). Der Normbereich wird als schraffierte Fläche aufgezeigt; die offenen Kreise entsprechen Präinfusionswerten von Patienten, die im Verlauf der jeweiligen Infusion allergische Reaktionen zeigten.

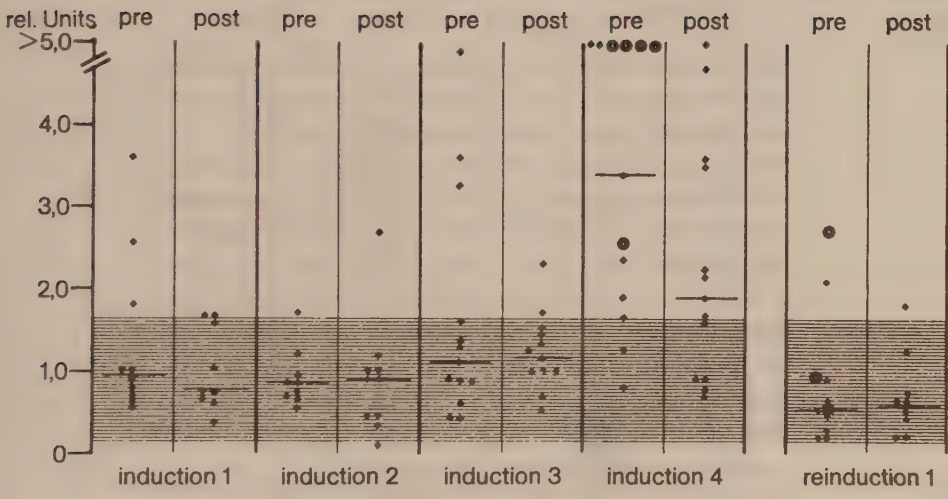


Fig. 12 :

Entwicklung der spezifischen IgM - Antikörper gegen L-Asparaginase im Verlauf der Therapie

Die Wiedergabe einzelner Details entspricht derjenigen bei der Darstellung der Entwicklung spezifischer IgG-Antikörper (s. Fig. 11).

Erstaunlicherweise ist gerade bei diesem Patienten die allergische Reaktion erst 30 Minuten nach Beginn der l-Asparaginase - Infusion aufgetreten.
Erwähnenswert ist noch, daß von den insgesamt 27 Infusionen mit erhöhten Anti-l-Asp IgG-Antikörpertitern prä infusionem - einschließlich der Infusionen mit späterer allergischer Reaktion - bei 23 eine Abnahme der Werte und nur bei 4 Fällen eine Zunahme der Titer unter der Infusion zu verzeichnen war.

Die Entwicklung der Anti-l-Asp-IgM-Antikörper im Verlauf der Therapie weist Ähnlichkeiten mit derjenigen der oben beschriebenen spezifischen IgG-Antikörper auf.
Von der ersten bis zur dritten Infusion der Induktionsphase bewegen sich die ermittelten Mediane im Normbereich. Ein deutlicher Anstieg des Präinfusionsmedians besteht nur zwischen der 3. und 4. Infusion der Induktion; unter der 4. Infusion fallen dann auch die Antikörpertiter im Median beträchtlich ab. Die Werte vor der ersten Infusion der Reinduktionsphase sind im Gegensatz zu den bei den Anti-l-Asp-IgG-Antikörpern gefundenen Verhältnissen nicht mehr erhöht und zeigen dementsprechend auch keine wesentlichen Veränderungen unter der Infusion.
Über die auf einzelne Patienten bezogene Entwicklung der Anti-l-Asp IgM-Antikörper (hier nicht dargestellt) ist folgendes zu konstatieren: Bei 9 der insgesamt 16 Patienten ohne allergische Reaktionen erfolgt im Verlauf der Infusionen der Induktionsphase ein kontinuierlicher Anstieg; weitere 3 Patienten zeigten keine zunehmende Antikörperbildung und 4 Kinder wiesen schon vor der ersten Infusion erhöhte spezifische IgM-Antikörperspiegel auf.
In 10 Fällen von insgesamt 19, bei denen prä infusionem erhöhte IgM-Titer vorlagen, war unter der entsprechenden Infusion ein Titerabfall um mindestens eine Titerstufe zu verzeichnen. Nur bei einem Patienten konnte bei erhöhtem Präinfusionswert ein Anstieg gemessen werden.

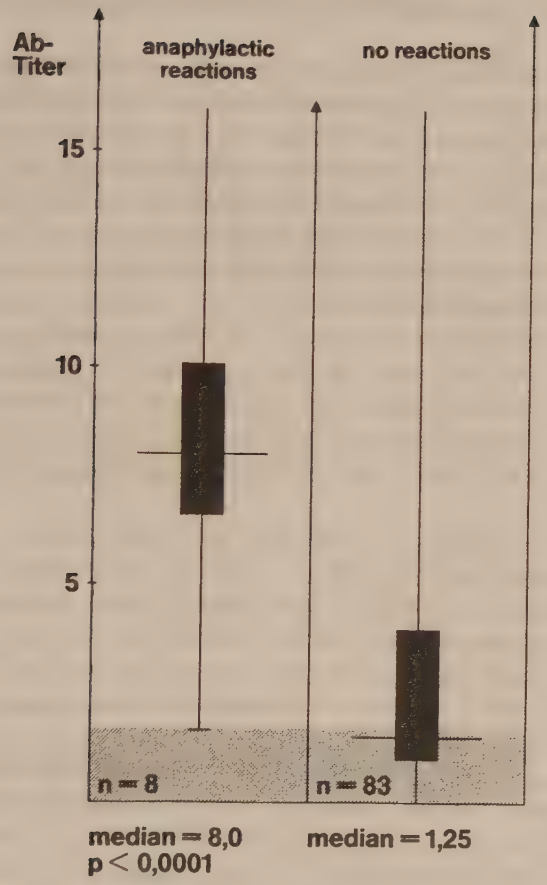


Fig. 13:

Vergleich der IgG - Antikörper - Titer gegen L-Asparaginase prä infusionem zwischen mit allergischen Reaktionen verbundenen und klinisch gut tolerierten Infusionen (box plot)
Der Normbereich ist als schattierte Fläche gekennzeichnet.
Die Differenz zwischen beiden Patientengruppen ist statistisch signifikant; dennoch ist keine Voraussage das Auftreten allergischer Reaktionen betreffend möglich.

4. Beziehung zwischen der Höhe von Anti-l-Asp-Antikörpertitern und auftretenden allergischen Reaktionen

In bisherigen Untersuchungen, in denen Anti-l-Asp-Antikörper bestimmt wurden (z.B. Dohlwitz et al., 1970; Peterson et al., 1971), ist es nicht gelungen, eine eindeutige Beziehung zwischen auftretenden allergischen Reaktionen und der Höhe der gemessenen Antikörperspiegel nachzuweisen. Da im Rahmen dieser Studie ein neuer sehr empfindlicher Test zur Messung spezifischer Antikörper entwickelt wurd, lag nahe, dieser Frage erneut nachzugehen.
Nach den diesbzgl. Analysen kann nun hier belegt werden, daß bei den Patienten, die unter l-Asp-Gabe allergische Reaktionen erlitten, in den meisten Fällen prä infusionem erhöhte Antikörperspiegel - IgG und IgM - vorhanden sind (bei 7 von 8 Fällen IgG erhöht, bei 6 von 8 Fällen IgM erhöht).
Es müssen jedoch zwei Einschränkungen gemacht werden:

1. Es sind auch Patienten mit Überempfindlichkeitsreaktionen angetroffen worden mit nicht oder nur wenig erhöhten Anti-l-Asp-Antikörpertitern (s. oben).
2. Die IgG - und IgM - Antikörperspiegel sind bei einigen Patienten, die keine allergischen Reaktionen gezeigt hatten, ebenfalls deutlich über den Normbereich erhöht.

Insgesamt bestehen allerdings, wenn die gut tolerierten Infusionen mit den Infusionen, unter denen anaphylaktische Reaktionen beobachtet wurden, verglichen werden, signifikante Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen (Fig. 13). Der Median der Gruppe mit allergischen Reaktionen ist signifikant höher als derjenige der Gruppe ohne Reaktionen.
Anzumerken sind noch weitere Besonderheiten: Zwei Patienten hatten schwere Hypersensitivitätsreaktionen, die mit einem Kreislaufzusammenbruch verbunden waren, erlitten. Während bei einem dieser Patienten der höchste aller gemessenen Anti-l-Asp-IgG-Antikörperspiegel vor der entsprechenden Infusion gefunden wurde, zeigte der zweite Patient nur einen noch im Normbereich liegenden IgG-Ak-Spiegel.

5. Verhalten des Komplementsystems im Verlauf der Therapie mit l-Asparaginase

Im vorangehenden Teil der Arbeit ist die Entwicklung spezifischer Anti-l-Asp-Antikörper beschrieben worden. Um der Frage nachzugehen, ob diese Antikörper befähigt sind, das Komplementsystem zu aktivieren, wurden eventuelle Reaktionen des Komplementsystems anhand verschiedener Parameter näher untersucht.
Im weiteren werden die Ergebnisse dieser Analysen in Bezug auf allgemeine Veränderungen und Unterschiede zwischen Fällen mit und ohne allergische Reaktionen wiedergegeben.

5.1. Verhalten des Komplementsystems unabhängig von allergischen Reaktionen

In allen folgenden Abbildungen sind die Daten der Komplementanalysen jeweils prä infusionem dargestellt. Es sind nur die Ergebnisse der Untersuchungen in der Induktionsphase der Therapie aufgeführt, da in der Reinduktionsphase nur von wenigen Patienten genügend Material gewonnen werden konnte.

Die gesamthämolytische Aktivität des klassischen Komplementweges ist in Fig. 14 graphisch zusammengefasst. Der Präinfusionsmedian liegt für alle 4 Infusionen der Induktion im Normbereich, wenn auch für die 2. Infusion grenzwertig. Er sinkt jedoch nach der ersten Infusion ab, so daß die weiteren Werte um 2o bis 40 % des gepoolten Serumstandards erniedrigt sind. Der bei den beiden letzten Infusionen zu verzeichnende Anstieg könnte auf eine " Erholung " des Komplementsystems hinweisen.

Die aus Fig. 15 ersichtlichen Ergebnisse zur gesamthämolytischen Aktivität des alternativen Komplementweges unterscheiden sich deutlich von den vorangehenden des klassischen Komplementweges.

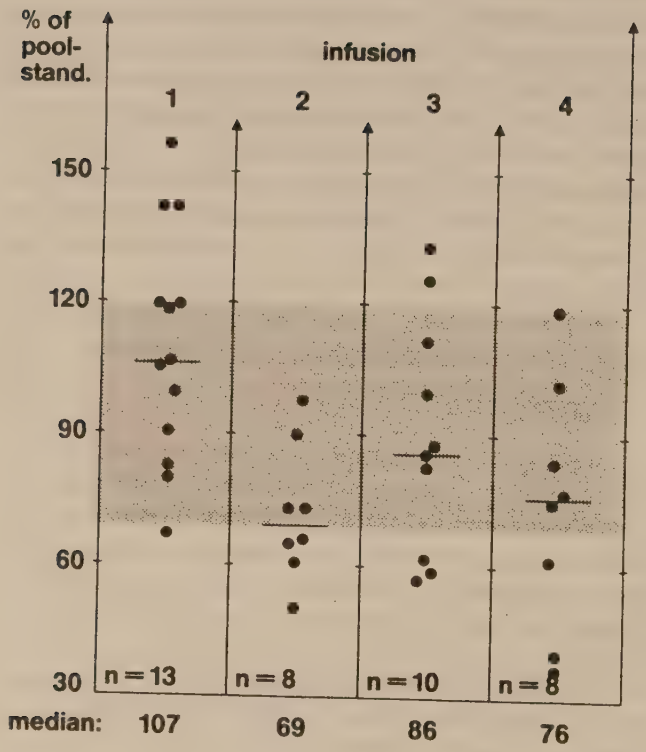


Fig. 14 :

Verhalten der gesamthämolytischen Aktivität des klassischen Komplementweges vor den Infusionen 1 - 4 der Induktionsphase

Gekennzeichnet sind Einzelwerte, Mediane und der Normbereich.

Es sind nur Werte prä infusionem aufgeführt.

Die Komplementaktivität des klassischen Weges ist nach der ersten Infusion deutlich erniedrigt.

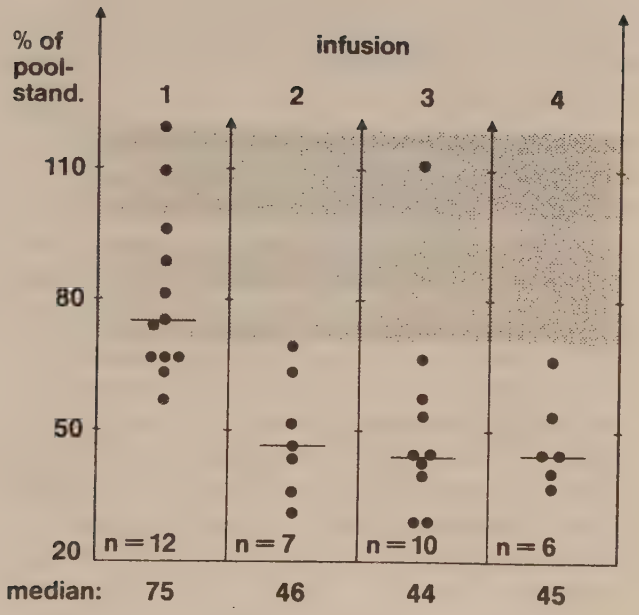


Fig. 15 :

Verhalten der gesamthämolytischen Aktivität des alternativen Komplementweges (AP 50) vor den Infusionen 1 - 4 der Induktionsphase

Die Verwendung der Symbole gleicht der bei Fig. 14.

Die lytische Kapazität des Komplementsystems auf alternativem Weg ist nach der ersten Infusion stark herabgesetzt.

Hier ist nach der ersten Infusion eine Abnahme der lytischen Kapazität um ca. 30 % des gepoolten Serumstandards registrierbar; der Median bleibt während der nachfolgenden Infusionen nahezu unverändert. Da der Median der ersten Präinfusionswerte schon im unteren Teil des Normbereiches placiert ist, sind diejenigen der nachfolgenden Infusionen weit unterhalb der 95 % Vertrauensgrenze zu finden. " Erholungstendenzen " wie bei der gesamthämolytischen Aktivität des klassischen Weges sind nicht erkennbar.

Als weiterer Indikator für den Funktionszustand des alternativen Weges wurde Faktor B bestimmt. Dabei zeigt sich in guter Übereinstimmung mit dem funktionellen Zusammenhang beider Tests ein analoges Verhalten. Der Median fällt nach der ersten l-Asp-Gabe unter den Normbereich ohne Zeichen eines Wiederanstieges ab (Fig. 16).

Parallel dazu wurde als Indikator für die Aktivierung des klassischen Weges das Verhalten der Komponente C4 analysiert. Interessanterweise kann hier kein Abfall, sondern eher ein Anstieg der Konzentrationen im Verlauf der Therapie, besonders zwischen der zweiten und dritten Infusion festgestellt werden. Die ermittelten Mediane bewegen sich jedoch für alle Infusionen im Normbereich (Fig. 17).

Die auf einfache Art und Weise bestimmbaren Konzentrationsänderungen von C3 werden durch beide Aktivierungswege beeinflusst. Bei ihrer Analyse ergibt sich eine erwartete Abnahme der Konzentrationen im Median nach der ersten Infusion, ohne daß der Normbereich unterschritten wird (Fig. 18).

Um bei den oben genannten Veränderungen des Komplementsystems bei Patienten ohne allergische Reaktionen unter l-Asp-Therapie zwischen einem gesteigerten Komplementverbrauch oder einer verminderten Synthese differenzieren zu können, wurden zwei weitere Komplementfaktoren in EDTA-Plasma gemessen. Diese - C3d und Spaltprodukte von

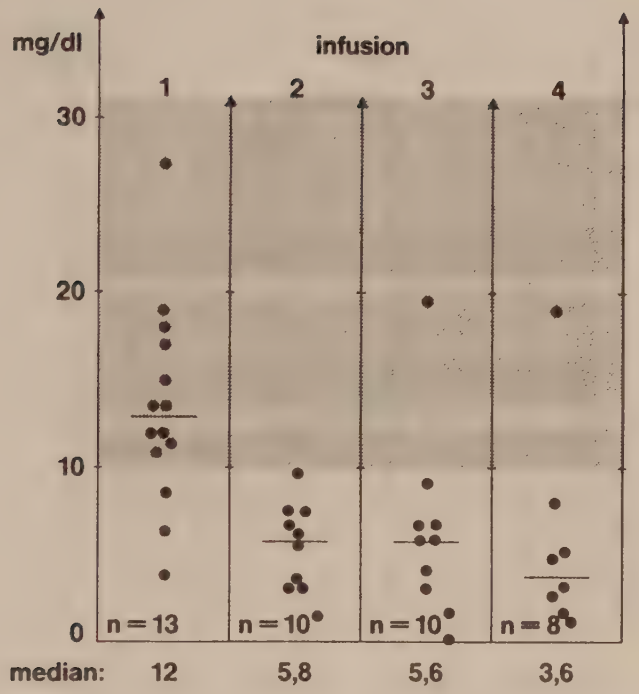


Fig. 16 :

Entwicklung der Faktor B - Konzentrationen unter der 1-Asp - Therapie

Der Normbereich wird durch die schraffierte Fläche angegeben. Das Verhalten von Faktor B verläuft analog zu dem der gesamthämolytischen Aktivität des alternativen Komplementweges.

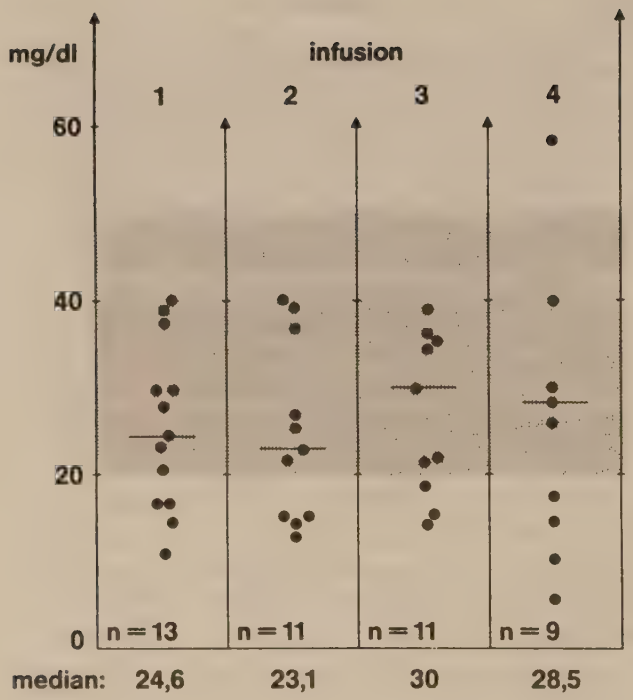


Fig. 17 :

Entwicklung der C 4 - Konzentrationen während der Induktionsphase der l-Asp - Therapie

Die Verwendung der Symbole gleicht der der vorausgehenden Abbildungen.

Im Gegensatz zu anderen gemessenen Komplementkomponenten zeigen die C 4 - Konzentrationen unter l-Asparaginase - Gabe einen leichten Anstieg.

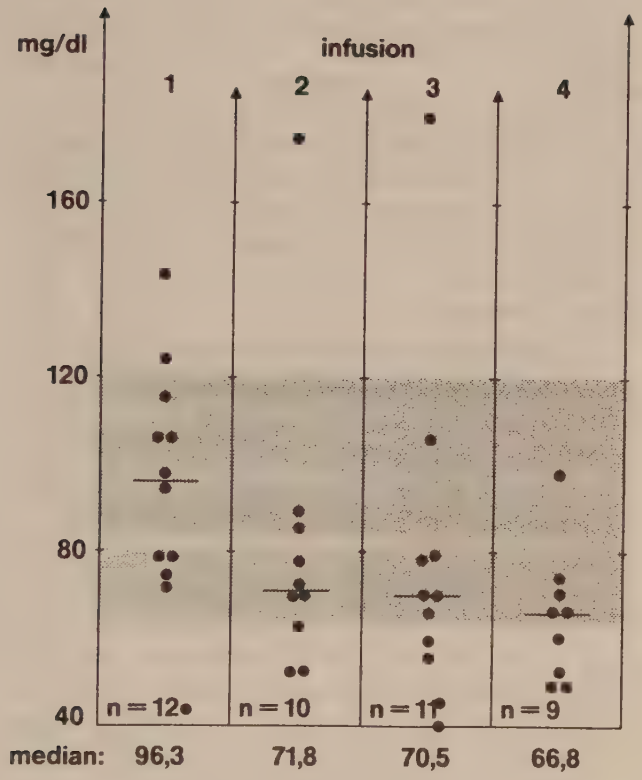


Fig. 18 :

Entwicklung der C3 - Konzentrationen während der Induktion mit l-Asparaginase

Die Verwendung der Symbole entspricht der der vorausgehenden Abbildungen.

Die C3 - Konzentrationen zeigen die erwartete Abnahme nach der ersten Infusion; die Mediane liegen bei den Infusionen 1 - 4 im Normbereich.

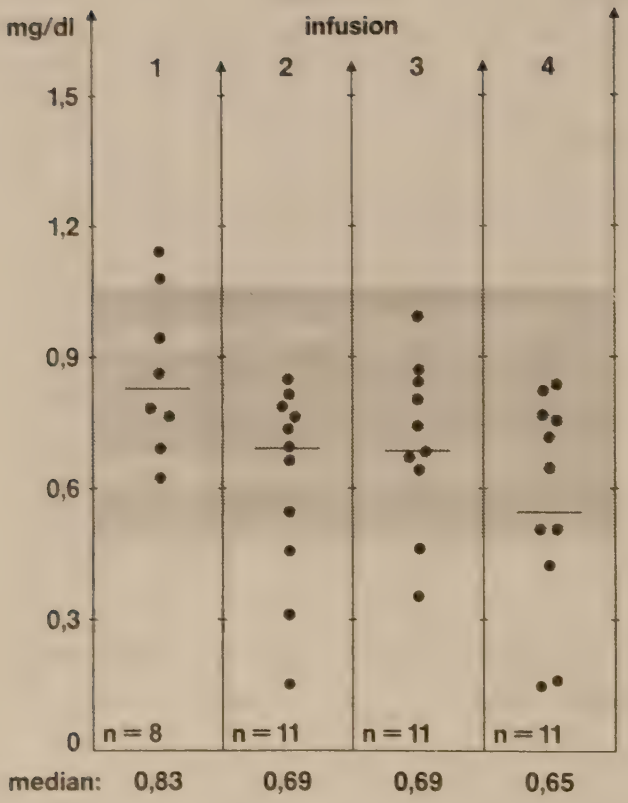


Fig. 19:

C3d - Spiegel der Infusionen 1 - 4 der Induktionsphase

Die Verwendung der Symbole entspricht der der vorausgehenden Abbildungen.

Die Mediane der C3d - Spiegel sinken ähnlich wie bei anderen schon dargestellten Komplementkomponenten unter der Therapie leicht ab, was eher auf eine verminderte Synthese als auf vermehrten Verbrauch hinweist.

Faktor B - entstehen beim Abbau von C3b bzw. Faktor B und zeigen insofern eine stattgehabte Aktivierung des Komplementsystems an.

Die Spiegel des C3d - Antigens, deren Bestimmung durch die vergleichsweise längere Halbwertszeit des C3d gegenüber C3b erleichtert wird (Teisner et al., 1983), sind in Fig. 19 schematisch dargestellt. Die Mediane tendieren zu einer leichten Abnahme im Verlauf der vier Infusionen, liegen jedoch alle im Normbereich. Es muß noch einmal betont werden, daß bei diesen Betrachtungen die Infusionen mit allergischen Reaktionen ausgeklammert sind.

Bei einer Aktivierung des alternativen Komplementweges wird Faktor B in Ba und Bb gespalten, wobei letzteres mit C3b in den weiteren Aktivierungsvorgang mit einbezogen wird. Eine Aktivierung kann in vitro durch den Zusatz von Zymosan ausgelöst werden. Bei der elektrophoretischen Untersuchung von Faktor B - Spaltprodukten dient derartig behandeltes EDTA-Plasma als Positivkontrolle, während als Negativkontrolle gepooltes Normal-EDTA-Plasma herangezogen werden kann (Fig. 20).
Bei den von uns untersuchten Patienten konnten keine Spaltprodukte von Faktor B nachgewiesen werden.

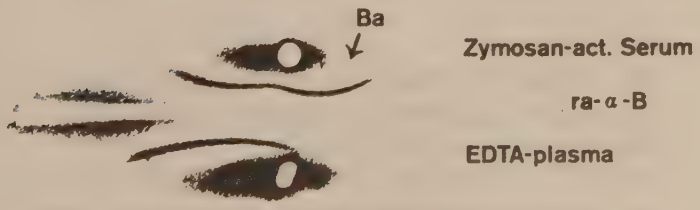


Fig. 20 :
Positiv - und Negativkontrolle der Spaltung von Faktor B

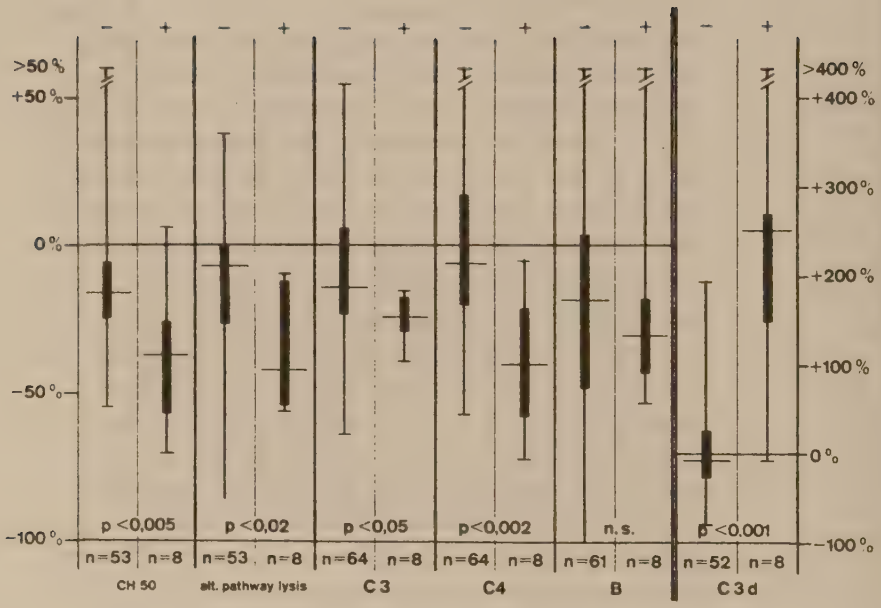


Fig. 21 :

Vergleich der Veränderungen im Komplementsystem unter l-Asparaginase - Infusionen mit und ohne allergische Reaktionen (box plot Darstellung)

Unter den Infusionen mit allergischen Reaktionen (+) treten bzgl. aller dargestellten Parameter außer Faktor B statistisch signifikant größere Veränderungen auf als bei den klinisch gut tolerierten Infusionen (-).

Tab. 4 : Veränderungen im Komplementsystem und der Anti-l-Asp-IgG-Antikörpertiter bei von Anaphylaxie begleiteten Infusionen

Patient	CH 50		AP 50		C3		C4		B		C3b		C3d		A.-l-Asp-IgG	
	prä	post	prä	post	prä	post	prä	post	prä	post	prä	post	prä	post	prä	post
1. Ba.T.	155	93	49	44	78	59,5	36	28,5	17,2	12,2	-	-	0,79	0,74	3,4	1,02
2. Ar.J.	128	36	67	27	74	63,1	59,5	24,6	14	8	-	+	1,4	2,8	10,1	4,0
3. Bu.S.	95	30	57	38	78	52,2	21,8	9	9,8	8,6	-	+	0,78	2,8	367	276
4. Gü.G.	77	54	53	23	59,5	42,7	40,7	19	3	1,4	-	+	0,76	2,03	7,3	3,4
5. Ko.R.	82	87	58	51	70,5	59,5	33	24,4	0,6	4	-	+	0,16	2,64	0,85	1,85
6. Ne.M.	87	44	70	31	70,5	42,7	36	34,4	9,2	6,4	-	+	0,51	2,49	8,7	4,1
7. Sc.A.	119	92	65	31	98,2	74,2	58	15,6	4,8	5,9	-	+	0,76	2,8	6,5	5,1
8. Ze.A.	150	65	70	60	54,1	74,2	52,5	40,7	15,1	9,8	-	+	0,8	2,8	20	20
Normber.:	80 - 120 % d.N.		75 - 125 % d.N.		65 - 120 mg/dl		20 - 50 mg/dl		10 - 40 mg/dl		qual.		0,55 - 1,1 mg/dl		0 - 1,6 rel. E.	

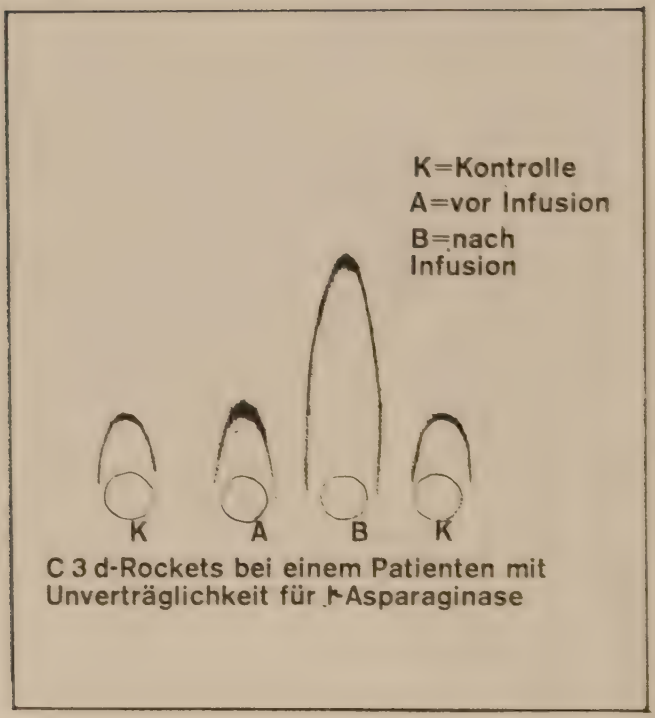


Fig. 22 :

Beispiel für die Entwicklung des C3d - Spiegels bei einer Patienten mit einer allergischen Reaktion unter der l-Asparaginase-Infusion

Als Kontrolle wurde gepooltes Normal-EDTA-Plasma eingesetzt. Wie die Rocketelektrophoresen zeigen, ist die C3d - Konzentration nach der Infusion um ein mehrfaches erhöht, während sie vorher im Normbereich lag. Das ist als Zeichen einer vermehrten C3 - Spaltung zu werten.

5.2. Verhalten des Komplementsystems unter Infusionen von l-Asparaginase mit allergischen Reaktionen

Wie schon erwähnt, wird im Rahmen einer ablaufenden allergischen Reaktion eine allgemeine Abnahme von Komplementfaktoren und ein deutlicher Anstieg anfallender Abbauprodukte, z.B. von C3d, erwartet.

Bestätigend wurden bei den in dieser Studie untersuchten 8 Patienten mit allergischen Reaktionen Verminderungen von C3, C4, Faktor B, der gesamthämolytischen Aktivität des klassischen und des alternativen Systems registriert (Tab. 4). Diese Veränderungen übersteigen statistisch signifikant für alle Parameter außer Faktor B das Ausmaß gleichgerichteter Veränderungen bei Patienten ohne allergische Reaktionen (Fig. 21).
Bei den Analysen von Faktor B ergibt sich keine statistisch signifikante Differenz zwischen Verringerungen bei gut tolerierten im Vergleich zu Infusionen mit allergischen Reaktionen.

Ein entscheidender Unterschied zwischen diesen beiden Patientengruppen wird mit den Resultaten der C3d - Bestimmungen deutlich. Während bei Patienten, die die Infusion gut toleriert haben, C3d unverändert blieb oder sogar, wie der Median anzeigt, leicht abfiel, kam es bei Patienten mit anaphylaktischen Reaktionen - mit Ausnahme eines Patienten zu einem drastischen Anstieg. Mit Fig. 22 ist ein Beispiel für eine solche Steigerung bei einem Patienten mit allergischer Reaktion dargestellt.
In Fig. 23 sind die C3d - Konzentrationen, die nach den entsprechenden Infusionen gemessen wurden, beider Patientengruppen einander gegenübergestellt. Die überwiegende Zahl der Postinfusionswerte für Patienten mit unauffälligem Verlauf ist im oder unterhalb des 95 % Vertrauensbereiches angesiedelt; kein Patient wies einen Spiegel oberhalb von 1,9 mg/dl auf. Hingegen sind bei 7 von 8 Kindern mit allergischen Reaktionen C3d - Konzentrationen oberhalb von 2,0 mg/dl zu finden. In 5 Fällen liegen sie sogar

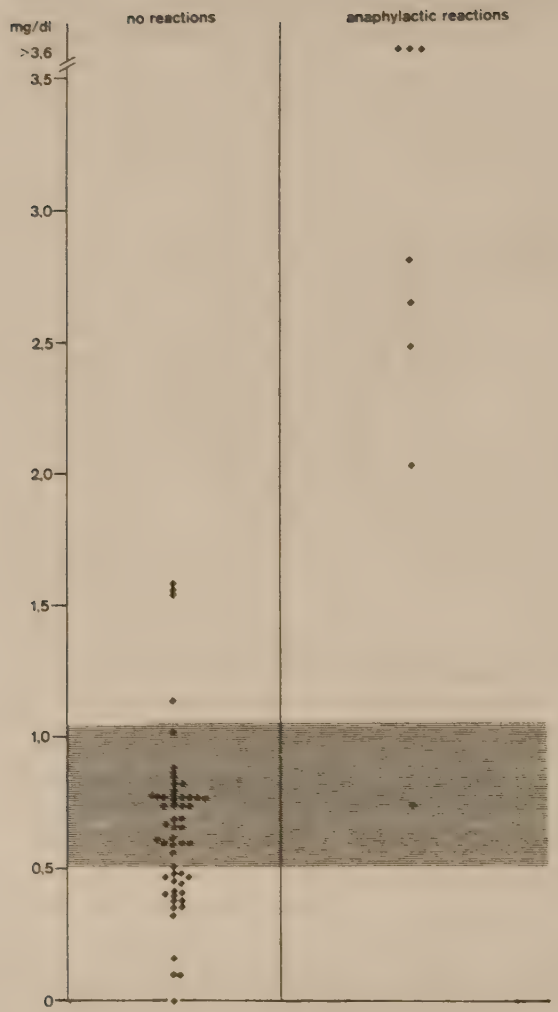


Fig. 23:

Gegenüberstellung der C3d - Spiegel nach Infusionen von l-Asparaginase mit und ohne allergische Reaktionen

Die C3d - Spiegel der gut tolerierten Infusionen liegen ausnahmslos unterhalb von 1,9 mg/dl, während die der Infusionen mit Reaktionen, einen Wert ausgenommen, oberhalb von 1,9 mg/ml gelegen sind.

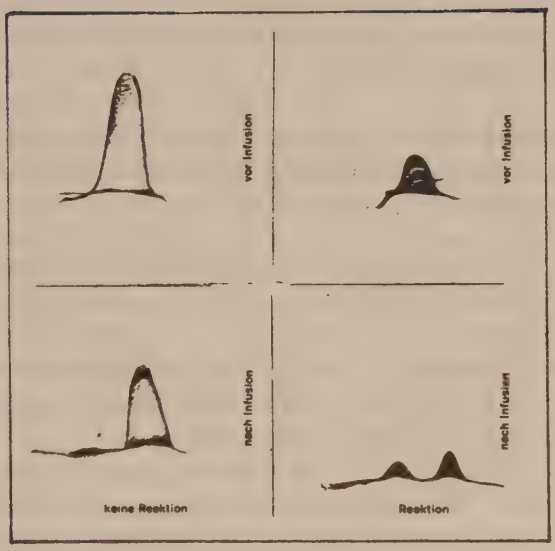


Fig. 24 :

Demonstration von C3 - Spaltprodukten durch die gekreuzte Immunelektrophorese mit Patienten-EDTA-Plasma gegen Kaninchen Anti-Human-C3 Antikörper.

Die Immunelektrophoresen sind jeweils mit EDTA-Plasma, das vor und nach den Infusionen gewonnen wurde, durchgeführt worden. Es sind vergleichend abgebildet die Ergebnisse einer klinisch gut tolerierten (links) und einer mit einer allergischen Reaktion verbundenen (rechts) Infusion.

Nach der zweiteren kann deutlich die Spaltung von C3 in C3a und C3b festgestellt werden.

über 2,5 mg/ml, das heißt über dem 2,5 fachen der oberen Grenze des Vertrauensbereiches.

Parallel zu den aufgezeigten Veränderungen von C3d gelingt bei den Patienten mit hypersensitiven Reaktionen der Nachweis von C3b in der gekreuzten Immunelektrophorese (Fig. 24). C3b konnte bei gut toleriertan Infusionen nicht nachgewiesen werden.

6. Zusammenhang von Komplementsystem und Anti-l-Asp-Antikörpern bei mit allergischen Reaktionen verbundenen Reaktionen

Unter Betrachtung der Anti-l-Asp-Antikörpertiter können die Fälle mit allergischen Reaktionen in 3 Gruppen unterteilt werden:

a) Der Patient Nr. 5 (Gü.,G.) hat nur leicht erhöhte IgG - Antikörpertiter, seine IgM - Spiegel liegen aber außerhalb des Normbereiches.
b) Der Patient Nr. 1 (Ba., T.) weist lediglich mäßig erhöhte IgG - Antikörpertiter auf.
c) Bei den restlichen Patienten wurden deutlich erhöhte spezifische IgG - Antikörperspiegel gemessen.

Diese verschiedenen Verhaltensweise bzgl. der Anti-l-Asp-Antikörpertiter sind gekoppelt mit differierenden Veränderungen innerhalb des Komplementsystems unter l-Asp-Infusion.

Zu a) :

Bei diesem Patienten dürften überwiegend Anti-l-Asp-IgM-Antikörper an der Auslösung der anaphylaktischen Reaktion beteiligt sein. Es ist keine Verminderung der gesamthämolytischen Aktivität des klassischen Weges unter der Infusion zu verzeichnen; damit korreliert die relativ geringe Abnahme der Konzentration von C4. Als Zeichen einer dennoch vorhandenen Gesamtaktivierung sind ein deutlicher Anstieg von C3d sowie nachweisbare Mengen von C3b meßbar.

Zu b) :

In diesem Fall wurden neben den mittelgradig erhöhten

IgG - Antikörpertitern eine klare Abnahme der gesamthämolytischen Aktivität des klassischen Weges und eine weniger ausgeprägte der Konzentration von C4 registriert. Die lytische Kapazität des alternativen Weges war schon vor der Infusion hochgradig eingeschränkt. Die vor und nach der Infusion bestimmten C3d-Spiegel zeigen keine C3 - Spaltung an; C3b konnte immunelektrophoretisch nicht nachgewiesen werden.

Zu c) :

Bei den dieser Gruppe zugeordneten 6 Patienten wurden deutliche Verminderungen der gesamthämolytischen Aktivität des klassischen und auch des alternativen Weges gemessen. Die Konzentrationsabnahmen von C3 sind relativ weniger ausgeprägt als die von C4. Dabei steigen erstaunlicherweise die C3d - Spiegel unter den Infusionen auf Werte über 2,0 mg/dl an. C3b wurde ebenfalls in immunelektrophoretisch nachweisbaren Mengen gefunden.

7. Kreuzreaktivität zwischen Erwinia und E.coli l-Asparaginase - Antigen

Der Nachweis einer eventuell vorhandenen Kreuzreaktivität wurde auf zweierlei Arten geführt:

Als erstes wurden verschiedene Konzentrationen von E.coli und Erwinia l-Asparaginase mittels Ouchterlony - Diffusion gegen verschiedene Verdünnungen des experimentell hergestellten Anti-l-Asp-Antikörpers vom Kaninchen inkubiert. Es zeigte sich, daß bei einer Konzentration von 200 E/ml E.coli l-Asp nach 48 stündiger Inkubation gegen den unverdünnten Antikörper ein gut konturiertes Präzipitat zu sehen war.

Bei Einsetzen der Erwinia - Asparaginase konnte, selbst unter Verwendung einer Konzentration von 20000 E/ml, kein Präzipitat abgegrenzt werden (Fig. 25).

Zusammengefasst bedeutet das, daß bei Austestung der beiden Arten der l-Asp gegen den Kaninchen-Anti-l-Asp-Antikörper keine Kreuzreaktivität zu bescheinigen ist.

1 = Crasnitin 200 U/ml
2 = Leunase 200 U/ml
3 = Erwinia-Asp 20 000 U/ml
4 = Erwinia-Asp 500 U/ml
5 = PEG-Asp 200 U/ml
6 = PEG-Asp 500 U/ml
7 = ra-α-Asp, IgG-fraction

Fig. 25 : Kreuzreaktivität zwischen Erwinia und E.coli Asparaginase (Ouchterlony - Diffusion)

Bei diesem Fotobeispiel sind E.coli Asparaginase (Crasnitin), in einer Konzentration von 200 U/ml (1), und Erwinia Asparaginase, in Konzentrationen von 20000 U/ml (3) und 500 U/ml (4), gegen spezifisches Kaninchenantiserum (ra-a-Asp, 7) inkubiert worden. Die anderen angegebenen Enzympräparationen dienen anderweitigen Studien und sollen hier nicht berücksichtigt werden.

Es ist keine Reaktivität der Erwinia - Asparaginase gegen den Kaninchenantikörper sichtbar.

Um die Kreuzreaktivität zwischen Erwinia und E.coli - Asparaginase in Bezug auf menschliche spezifische Antikörper zu prüfen, wurden als zweites je 100 E/ml jeder Asparaginase-art auf einer Mikrotiterplatte inkubiert. Anschließend wurde der Test zum Nachweis von spezifischen Anti-l-Asp - IgG - Antikörpern mit Patientenseren, die nachweislich hohe Titer dieser Antikörper hatten, durchgeführt.
Mithilfe dieses ELISA-Tests wurde lediglich auf einer mit Erwinia l-Asp inkubierten Mikrotiterplatte ein mäßig über den Normbereich erhöhter Antikörperwert gemessen. Daraus resultiert die Schlußfolgerung, daß zwischen Erwinia und E.coli Asparaginase in Bezug auf etwaige Reaktionen mit menschlichen Antikörpern eine nur geringe Kreuzreaktivität besteht.

V. Diskussion

1. L-Asparaginase - ein Medikament zur Behandlung von Leukämien

L-Asparaginase ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt ein essentieller Bestandteil der meisten Chemotherapieprotokolle zur Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie bei Kindern und Erwachsenen.
Die Wirksamkeit dieses Enzympräparates wurde als erstem in vitro von Broome (Broome, 1968) nachgewiesen, der als Wirkprinzip die Verminderung der extracellulären Konzentration von Asparagin als einer für bestimmte maligne Lymphomarten essentiellen Aminosäure herausstellte.
In vivo wurden diese Ergebnisse bestätigt von Oettgen (Oettgen et al., 1970) und nachfolgend vielen anderen. Einige Autoren konstatierten, daß l-Asp allein Remissionen einleiten könne (Wehinger et al., 1981), während andere den Erfolg vorwiegend in der Verlängerung der Remissionszeiten sahen (Holland et al., 1981).

Da die anti - leukämische Wirkung des Medikaments nicht wie bei fast allen anderen Cytostatika mit einer Knochenmarkdepression verbunden ist, kann es nahezu unbedenklich in Kombination mit anderen Chemotherapeutika eingesetzt werden. Der limitierende Faktor der l-Asparaginasetherapie besteht stattdessen - abgesehen von seltener auftretenden toxischen Nebenwirkungen - in der zunehmenden Sensibilisierung der Empfänger unter der Behandlung; so wurden in bis zu 33 % der Patienten allergische Reaktionen beobachtet (Evans et al., 1982). Für solche Reaktionen ist nach den Ergebnissen dieser Arbeit vorwiegend die Bildung Komplement (c) - fixierender IgG - Antikörper verantwortlich.

Eine Konsequenz nach derartigen Ereignissen besteht gewöhnlich im Abbruch der Therapie mit E.coli l-Asp und der Fortführung mit Erwinia l-Asparaginase.

Außerdem kann durch eine erfolgte Sensibilisierung auch das pharmakokinetische Verhalten der Asparaginase beeinflusst werden, wie es von unserer Arbeitsgruppe schon früher beschrieben wurde.

2. Reinheit der l-Asparaginase-Präparation

1967 wurde veröffentlicht, daß verschiedene l-Asparaginase-Präparationen mit Endotoxinen verunreinigt waren, die in vitro zu einer Komplementfixation führten (Loos et al., 1967). Beweisend wurden diese Endotoxine säulenchromatographisch isoliert und als E.coli - Lipopolysaccharide (durch E.coli gebildete Endotoxine) identifiziert. Um auszuschließen, daß die oft registrierten allergischen Reaktionen und die Antikörperbildung unter l-Asp - Gabe durch evtl. vorhandene Endotoxinverunreinigungen verursacht werden, habe ich das in unserer Klinik verwendete l-Asp-Präparat (Crasnitin^{R}, Bayer) säulenchromatographisch und auf seine immunologische Spezifität hin immunelektrophoretisch gegen das Kaninchen-anti-l-Asp-IgG analysiert.

Hierbei erwies sich das Präparat - soweit mit diesen Methoden erfaßbar - als hochgereinigtes Enzym. Demzufolge sind Antikörper, sofern sie unter der Therapie gebildet werden, spezifisch gegen das Enzym l-Asparaginase gerichtet, so daß dieses als Auslöser der beobachteten Schockreaktionen angeschuldigt werden muß.

3. Bildung spezifischer Antikörper unter l-Asp-Therapie

Zusätzlich zu ihrer anti-leukämischen Wirkung durch die Erniedrigung des extrazellulären Asparaginspiegels übt die l-Asparaginase immunsuppressive Effekte aus (Schwartz, 1969; Lauenstein et al., 1970; Schäffner et al., 1977), die sowohl die zelluläre als auch die humerale Abwehr betreffen.

Unter den meiner Studie zugrunde liegenden Bedingungen überwiegt einem etwaigen immundepressiven Effekt gegenüber

deutlich die Immunantwort auf l-Asp. Es entstehen spezifische Antikörper gegen das Fremdantigen - da aus E.coli gewonnene - Asparaginase.
Dabei können können im Verlauf der Induktionsphase generell zunehmende Antikörpertiter sowohl der IgM- als auch der IgG-Klasse nachgewiesen werden. In der Reinduktionsphase scheinen erkennbar an ihren erhöhten Spiegeln vorwiegend IgG - Antikörper im Vordergrund zu stehen.
Wachsende spezifische Antikörperspiegel sind hierbei auch bei Patienten zu finden, die zu späterem Zeitpunkt keine allergischen Reaktionen erlitten haben.
Das steht zum Teil im Einklang (Killander et al., 1976), zum Teil im Gegensatz zu den Erfahrungen anderer Autoren (Peterson et al., 1971). Peterson entdeckte ebenfalls spezifische Antikörper der IgG-, IgM- und nur in einem Fall der IgE-Klasse, jedoch ausnahmslos bei Patienten mit später auftretenden allergischen Reaktionen. Seiner Aussage zufolge treten diese mittels indirekter Hämagglutination gemessenen Antikörper unter der Behandlung nach einem Protokoll, das 20 Tage lang tägliche oder 2 tägige Asp-Gaben in einer Dosierung von 200 E/kg/die oder 1400 E/kg/Woche vorsah, zwischen acht und spätestens einem Tag vor der allergischen Reaktionen auf. Komlementfixierende Antikörper sollten erst 1 Woche nach der solchen zu messen sein.

Diese Divergenz zu meinen Ergebnissen läßt sich folgendermaßen erklären: Die Sensibilität des neu entwickelten Solid phase ELISA - Testes zur Messung spezifischer Anti-l-Asp-IgM- und IgG-Antikörper ist als entschieden höher anzusehen als die der von Peterson benutzten indirekten Hämagglutination, soweit ein Vergleich der beiden Methoden zulässig ist. Bei der vergleichenden Durchführung beider Methoden an Proben eines identischen Serums in unserem Labor stand ein gemessener ELISA-Ak-Spiegel von ca. 360 relativen Einheiten - ein extrem hoher Wert - einem Titer in der indirekten Hämagglutination von 1:160 - einem relativ niedrigen Wert - gegenüber.

Andererseits sind direkte Vergleiche zu anderen Studien erschwert durch die meist differierenden Behandlungsprotokolle. So erhielten die Patienten in der o.g. Studie weit geringere l-Asp - Gesamtmengen als die von uns untersuchten Patienten, denen nach dem COALL 82 Protokoll 4 x 3000 E/kg Kg in 3 tägigem Abstand verabreicht wurden.
Die Änderung der Asparaginasegabe in neuerer Zeit zugunsten einer höheren Dosierung basiert auf der Erfahrung, daß dadurch Häufigkeit und Ausprägung toxischer Nebenwirkungen nicht entscheidend gesteigert werden, die immunsuppressive Wirkung der l-Asp jedoch gegenüber ihrer Antigenität an Boden gewinnt, so daß weniger allergische Reaktionen zu befürchten sein sollten. Maral konnte schon früh tierexperimentell belegen (Maral, 1971), daß bei niedriger l-Asp-Dosierung später Antikörper gebildet werden, die schließlich erreichten Titer aber über denen bei höherer Dosierung lagen. Ähnliche die Sensibilisierung fördernde Effekte sah er auch in Abhängigkeit von der Häufigkeit der Applikationen und vom Reinheitsgrad des verwendeten Medikamentes.

Im Gegensatz zu Peterson's Aussage, daß es bei vorhandenen Antikörpern unter der l-Asp-Gabe zu einem schnelleren Abfall des wirksamen Spiegels derselben kommt, deklarierte Maral keinerlei Funktionseinschränkung durch die Antikörper- und nachfolgende Immunkomplexbildung.
Wir haben - wie schon veröffentlicht (Wahn et al., 1983) - eine in diesem Zusammenhang sogar verlängerte Halbwertszeit der Asparaginase ermittelt. Interessanterweise beschrieb Killander bei Patienten mit nachweisbaren bivalenten (IgG) Antikörpern gegen l-Asp höhere Remmisionsfrequenzen (68 % zu 27 %, nicht statistisch signifikant), auch wenn er unter der Antikörperbildung eine verminderte Serumaktivität der Asparaginase sah. Es wäre denkbar, daß über den Mechanismus der Immunkomplexbildung die Elimination der Asparaginase verzögert und so ihre Wirksamkeit ausgedehnt wird; bei Ablagerung der Immunkomplexe in Geweben käme es in anderen Fällen zu der herabgesetzten Asp-Aktivität. Möglicherweise geben jedoch die geringeren Remissionsquoten bei Patienten

ohne spezifische Antikörper lediglich die allgemein deletäre Abwehrlage wieder.

Interessant ist weiterhin die Beziehung von spezifischen Anti-l-Asp-IgG - und IgM - Antikörpern zueinander. Bei beiden Antikörperklassen sind stetig steigende Titer im Verlauf der Induktionsphase zu verzeichnen, die auch bei beiden ähnlich erst zum Zeitpunkt der vierten Infusion oberhalb des Vertrauensbereiches liegen (Fig. 11 und 12). Vor der ersten Infusion der Reinduktionsphase jedoch sind die IgM - Antikörperspiegel im Median wieder in den Norm- abgesunken, wohingegen die IgG - Antikörpertiter im Median noch eindeutig über die 95 % Vertrauensgrenze erhöht sind. Dieses unterschiedliche Verhalten beider Antikörperklassen deutet auf eine möglicherweise kontinuierliche Immunisierung gegen l-Asparaginase auch über den Zeitraum der eigentlichen Therapie hin. Bei einer Halbwertszeit des IgG von ca. 2o Tagen und einem therapiefreien Intervall von ca. 2 Monaten zwischen Induktions- und Reinduktionstherapie nach dem COALL 82 Protokoll wäre nämlich anderenfalls eine ausgeprägtere Abnahme der spezifischen IgG - Titer zu erwarten. Zur Ergänzung der allgemeinen Darstellung in Fig. 11 möchte ich folgende patientengebundenen Daten übermitteln (Tab. 5):

Patienten	IgG-Anti-l-Asp-Antikörpertiter	
	4.Inf. Induktion	1.Inf. Reinduktion
Ar.,J. +	7,2	10,1 +
Ba.,T.	ca. 0,2	3,4
Do.,S.	0,5	3,3
Gü.,G. +	7,3	10,7 +
Ko.,M. +	1,5	12,1 +
Ne.,M. +	8,7	3,2 +
Re.,F.	0,6	1,3
Ro.,L.	6,9	7,8
St.,M.	3,2	3,5

Tab. 5 : Vergleich der IgG-anti-l-Asp-Antikörpertiter bei Patienten zum Zeitpunkt der 4. Infusion der Induktion zur 1. Infusion der Reinduktion (prä infusionem)
Patienten mit allergischen Reaktionen sind durch + gekennzeichnet.

Bei der Beurteilung der Titerbewegungen von der 4. Infusion der Induktion zu 1. Infusion der Reinduktion muß nämlich eine gewisse Auslese berücksichtigt werden. Zum einen handelt es sich um die zufällige Auslese durch das Therapieprotokoll (nur nach dem Pilot COALL 82 Protokoll behandelte Patienten erhielten auch in der Reinduktionsphase l-Asp), zum anderen die gerichtete Auslese der überwiegenden Anzahl von Patienten mit hohen Antikörpertitern schon vor der 4. Infusion der Induktion. Es handelt sich dabei um die Patienten, die - assoziiert mit hohen IgG-Ak-Spiegeln - allergische Reaktionen unter der l-Asp-Infusion zeigten, so daß auf die weitere Behandlung mit diesem Medikament verzichtet wurde. So entsteht in der Gesamtdarstellung der scheinbare Eindruck eines Abfalls der Anti-l-Asp-IgG - Antikörperwerte zur nächsten Infusion hin. Gegenteilig zeigt sich in der obigen Tabelle eher eine Zunahme der IgG-Spiegel von einer Infusion zur anderen. Bis auf einen Patienten scheint diese sogar besonders ausgeprägt bei den Kindern, die anaphylaktische Reaktionen unter der 1. Infusion der Reinduktion zeigten.

Die oben geforderte kontinuierliche Immunisierung gegen l-Asp im Zusammenhang mit den erläuterten Titerbewegungen der IgG-Antikörper könnte verursacht werden durch die Immunkomplexbildung aus beiden Komponenten. Lagern sich diese Immunkomplexen im Gewebe ab, wäre eine ständige antigenische Reizwirkung denkbar, ohne daß es zu einer akuten und raschen Komplementaktivierung käme.

Neben den besprochenen tendenziösen Entwicklungen sind verschiedene "Unregelmäßigkeiten" das Verhalten der spezifischen Anti-l-Asp-Antikörper betreffend zu diskutieren:

Bei einigen Patienten fielen schon vor der ersten l-Asp-Infusion über die Norm erhöhte spezifische IgG - und/oder IgM - Titer auf. Das kann denkbar einfach durch den früheren Kontakt dieser Patienten mit E.coli - Antigenen, wie er häufig im Rahmen einer Enteritis oder eines Harnweginfektes zustande kommen kann, erklärt werden, der zu einer Sensibilisierung gegen die entsprechenden Antigene führt.

Bei den meisten Patienten traten im Verlauf der Therapie mit l-Asparaginase spezifische Antikörper auf. Daneben haben einige Kinder keine mit dem ELISA-Test meßbaren Antikörper entwickelt. Insofern scheint es nicht nur eine Frage der Reinheit des Präparates (Maral, 1971), sondern auch der individuellen Disposition der Patienten zu sein, inwieweit eine Reaktion auf den Antigenreiz hin entsteht. Killander (Killander et al., 1976) hat etwa doppelt so häufig allergische Ereignisse bei erwachsenen Patienten im Vergleich zu Kindern beschrieben (28 % zu 16 %). Ursächliche Bedeutung könnten oben erwähnte Faktoren hierbei besitzen, nämlich der immunsuppressive Effekt der l-Asp und die Schwächung des Abwehrsystems durch die vorangegangene aggressive Chemotherapie, auf die die Patienten in unterschiedlichem Ausmaß reagieren. So fanden Evans et al., (1982) bei einer vergleichenden Studie an Patienten, die neben l-Asp auch Prednison und Vincristin erhielten, zu solchen, die nur mit l-Asparaginase behandelt wurden, heraus, daß die Patienten mit begleitender immunsuppressiver Therapie seltener Hypersensitivitätsreaktionen erlitten.

Bei der intraindividuellen Betrachtung des Antikörperverhaltens unter der Infusion werden in einigen Fällen Steigerungen der spezifischen Antikörpertiter ersichtlich. Man würde üblicherweise erwarten, daß die Titer durch den Verdünnungseffekt der Infusion und durch den Antikörperverbrauch bei Antigenzufuhr sinken, was ja auch bei der überwiegenden Zahl der Fälle eintrat. Erklären ließen sich die ungewöhnlichen Titerentwicklungen evtl. mit der akuten Freisetzung der Antikörper aus vorhandenen Speichern und mit der schon unter der Infusion einsetzenden Antikörperbildung (eine l-Asp-Infusion dauert in der Regel 4 - 6 Stunden), die den geschilderten Verlusten gegenüber überwiegen.

Abschließend bleibt noch einmal an die im Median unter l-Asp-Infusion statistisch signifikant abfallenden Titer der spezifischen Antikörper zu erinnern. Das zeigt am ehesten - neben dem zu vernachlässigenden Verdünnungseffekt - stattfindende Antigen-Antikörper-Reaktionen an, in deren Verlauf die Antikörper in spezifische Immunkomplexe eingebaut werden.

4. Spezifische Anti-l-Asp-Antikörper und allergische Reaktionen

Verschiedene Autoren fanden bei Patienten mit allergischen Reaktionen auf l-Asparaginase erhöhte Titer spezifischer Antikörper (Peterson et al., 1971; Killander et al., 1976; Dellinger et al., 1976; Spiegel et al., 1980; Evans et al., 1982). Dabei handelte es sich in erster Linie um IgG - und IgM - Antikörper; Ig E - Antikörper wurden seltener nachgewiesen, ohne einen Kausalzusammenhang mit allergischen Reaktionen feststellen zu können.
Dellinger beobachtete bei 33 % seiner Patienten allergische Reaktionen mit zum Teil lebensgefährlicher Ausprägung. Er beschrieb außerdem ein steigendes Risiko für das Auftreten solcher Reaktionen mit zunehmender Anzahl der l-Asp-Applikationen und dazu parallel mit wachsenden Antikörperspiegeln gegen l-Asparaginase.

Bei dem von mir untersuchten Patientengut bildeten sich bei 8 von insgesamt 24 Kindern unter der l-Asp-Therapie anaphylaktische Reaktionen aus. In zwei Fällen kam es zu einem Kreislaufkollaps mit Blutdruckabfall; noch schwerwiegendere oder tödliche Verläufe wurden nicht beobachtet. 7 der 8 Patienten besaßen vor der entsprechenden Infusion klar erhöhte Anti-l-Asp-IgG-Antikörpertiter. Die Höhe der IgG-Antikörperspiegel unterschied sich bei klinisch gut tolerierten Infusionen sogar statistisch signifikant von der bei Infusionen mit hypersensitiven Ereignissen (Fig. 13). Daher muß dem spezifischen IgG - Antikörpertiter ein relativer Wert an Prädiktion zugemessen werden.

In einem Fall wurden keine erhöhten IgG-Titer, sondern lediglich mäßiggradig erhöhte IgM - Antikörpertiter prä infusionem gefunden. Der Ablauf der nachfolgenden anaphylaktischen Symptomatik differierte von dem in den übrigen Fällen: Die Symptome waren weniger stark ausgeprägt und entwickelten sich erst ca. 30 Minuten nach Beginn der Infusion.
Bei einem weiteren Patienten wurde vor der mit der allergischen Reaktion verbundenen Infusion ein nur mäßig

gesteigerter IgG - Titer gemessen, so daß die Auslösung der Anaphylaxie durch von diesen Antikörpern unabhängigen Faktoren hier als wahrscheinlich erscheint (siehe unten).

Unter Ausklammerung dieser beiden Einzelfälle zeichnen sich die mit allergischen Reaktionen verbundenen Infusionen durch mindestens 6,5 relative Einheiten betragende IgG-Präinfusionstiter aus. Diese Marke wird nur in vier weiteren Fällen von insgesamt über 60 untersuchten Infusionen prä infusionem überschritten. Durch diese eingehende Schilderung soll verdeutlicht werden, daß das Prädiktionsmaß den spezifischen Anti-l-Asp-IgG-Test betreffend größer ist als es allein nach der isolierten Betrachtung von Infusionen mit anaphylaktischen Ereignissen scheint.

Ein praktischer Nachteil besteht allerdings auch bei unserem neuen ELISA-Test darin, daß die ausschlaggebenden, erhöhten IgG - Titer jeweils erst unmittelbar vor den mit allergischen Symptomen gekoppelten l-Asp-Verabreichungen gemessen werden können.

Bisherige Erfahrungen mit der Vortestung der immunologischen Reaktionslage mittels einer intravenösen Testdosis konnten nicht überzeugen (Evans et al., 1982). Vielleicht ist es in Zukunft möglich, das Risiko allergischer Reaktionen durch die Kombination der Gabe einer Testdosis und der IgG-Antikörpermessung mit dem relativ empfindlichen ELISA-Test abzuschätzen. Erwähnenswert ist, daß das Kind mit der schwersten Symptomatik einen Anti-l-Asp-IgG-Antikörpertiter prä infusionem von 270 relativen Einheiten aufwies.

Wie dieses auch schon in den Untersuchungen von Killander et al. (1976) beschrieben wurde, wurden auch bei Patienten, die die gesamte Behandlung mit l-Asp gut tolerierten, zum Teil deutlich erhöhte Anti-l-Asp-IgG-Antikörpertiter gemessen. Dafür sind zwei Erklärungsmöglichkeiten wahrscheinlich: Zum einen könnte die Verteilung der Antikörper innerhalb der IgG Subklassen zu IgG4 hin verschoben sein, wobei aufgrund der mangelnder Kapazität der zu dieser Subklasse gehörigen Immunglobuline keine Komplementaktivierung erfolgen könnte. Zum anderen hat möglicherweise die vorangehende Chemotherapie

bei diesen Patienten im Sinne einer Tachyphylaxie zu einer weitgehenden Mastzelldegranulierung geführt, so daß es nicht mehr zur Freisetzung von Histamin und den daraus resultierenden allergischen Symptomen kommen kann.

5. Mechanismus der allergischen Reaktionen unter Einbeziehung des Komplementsystems

Der Mechanismus der allergischen Reaktionen unter der Therapie mit l-Asparaginase war bisher unklar (Spiegel et al., 1980).
Es wurde postuliert, daß es sich um einen durch IgE, IgG oder IgM vermittelten Mechanismus handele, an dem evtl. Verunreinigungen des Präparates mit bakteriellem Antitoxin beteiligt wären (Dellinger et al., 1976).

Es ist bekannt, daß im Rahmen der Verquickung von Antigenen mit den entsprechenden Antikörpern unter Antikörperverbrauch Immunkomplexe gebildet werden können. Diese Immunkomplexe können wiederum über die CH2 - Domäne des inkorporierten IgG oder die CH3 - Domäne von IgM an C1q binden. Die Folge ist eine Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg (Theophilopoulos et al., 1979). Die Bindung an C1q erreicht ein Maximum unter leichtem Antigenüberschuß nahe dem Äquivalenzpunkt. Im Verlauf der weiteren Komplementaktivierung werden dann Kinine (C2b) und Anaphylatoxine (C3a und C5a) freigesetzt. Diese können Muskelkontraktionen der glatten Muskulatur, Histaminfreisetzung aus basophilen Leukocyten (C3a und C5a) und andere biologische Effekte auslösen.
Bei den von mir untersuchten Patienten wurden in 6 von 8 Fällen mit allergischen Symptomen erhöhte spezifische Antikörpertiter, insbesondere IgG - bestimmt. Demnach ist auch bei diesen Kindern eine Immunkomplexbildung unter der l-Asp - Infusion mit nachfolgender Aktivierung des klassischen Komplementweges wahrscheinlich. Die beobachteten klinischen Reaktionen würden vermittelt durch C2b bzw. C3a und C5a.

Ein identischer Mechanismus ist kürzlich bei einem Patienten mit einem erworbenen Antikörpermangelsyndrom und präzipitierenden IgG-Anti-IgA-Antikörpern beschrieben worden (Wahn et al., 1984). Die Zufuhr von Y-Globulinen, die auch IgA enthielten, führte über einen komplementvermittelten Mechanismus zu einer allergischen Reaktion, ohne daß IgE nachweisbar gewesen wäre.

Zur Überprüfung der oben geforderten Komplementaktivierung dienten die Analysen zahlreicher Komplementkomponenten. Üblicherweise wird als Zeichen einer allgemeinen Komplementaktivierung die Spaltung von C3 in C3a und C3b angesehen. Das Produkt C3b geht nicht in die weitere Aktivierungskaskade ein und wird zu C3c und C3d abgebaut.

7 von 8 der von mir beobachteten Patienten zeigten im Verlauf der allergischen Reaktion die Spaltung von C3 in C3a und C3b. C3a kann aus technischen Gründen in unserem Labor derzeitig noch nicht bestimmt werden, so daß die Beurteilung einzig an C3b bzw. seinen Abbauprodukten erfolgen mußte.
Hierbei kommt dem Nachweis steigender Konzentrationen des Abbauproduktes C3d unter den Infusionen besondere Bedeutung zu.

Beispielsweise fanden Brandslund et al. (1983) bei einem Patienten, der bei der Koagulation von Blasenpapillomen eine allergische Reaktion erlitt, eine Abnahme der gesamthämolytischen Aktivität des klassischen Komplementweges und eine deutliche Zunahme von C3c und C3d, während C3 nahezu unverändert blieb. Ein wesentlicher Vorteil der C3d - Bestimmung liegt in dessen relativ langer Halbwertszeit; sie wurde von Teisner et al. (1983) mit ca. 4 Stunden beziffert.

Parallel zu dem positiven Nachweis von C3b wurden bei den entsprechenden 7 Patienten hochgradige Steigerungen der C3d-Konzentrationen unter den Infusionen mit allergischer Symptomatik gemessen (Tab. 4). Die Veränderung der C3d-Spiegel unter diesen Infusionen war statistisch signifikant größer als bei l-Asp-Gaben, die gut toleriert wurden.

Die C3d-Werte nach mit Anaphylaxie gekoppelten l-Asp-Applikationen betrugen mindestens 2,0 mg/dl und mehr, während klinisch unauffällige Patienten nie höhere Konzentrationen als 1,7 mg/dl zeigten. Zusammengefasst scheint mit C3d ein wichtiger und zuverlässig meßbarer Parameter für komplementvermittelte allergische Reaktionen vorhanden zu sein.

Neben der C3-Spaltung konnte bei den Patienten mit anaphylaktischen Symptomen die geforderte Aktivierung des Komplementsystems auf klassischem Weg durch die in beiden Punkten statistisch signifikante Abnahme der gesamthämolytischen Aktivität dieses Weges wie des zugehörigen Faktors C4 bestätigt werden.

Da zusätzlich aber auch eine starke Senkung der gesamthämolytischen Kapazität des alternativen Weges und in einigen Fällen die Erniedrigung der Faktor B - Spiegel in Erscheinung traten, mußte eine mögliche Aktivierung des alternativen Weges gesondert ausgeschlossen werden.

Eine Aktivierung auf dem alternativen Weg kann ausgelöst werden durch IgA-haltige zirkulierende Immunkomplexe oder bakterielle Endotoxine, die ich allerdings nicht als Verunreinigungen in der verwendeten l-Asp-Präparation feststellen konnte. Die Folge einer solchen Aktivierung wäre die Spaltung von Faktor B in Ba und Bb.
Bei der immunelektrophoretischen Bestimmung der Spaltprodukte von Faktor B war in keinem Fall Ba abgrenzbar, so daß die Aktivierung des Komplementsystems auf alternativem Wege im Zuge der beobachten Anaphylaxien weitgehend auszuschließen ist.

Wie schon oben erwähnt unterschied sich ein Patient mit einer anaphylaktischen Reaktion von den übrigen dieser Gruppe durch die lediglich mäßig erhöhten Anti-l-Asp-IgG-Antikörpertiter (Ba., T.); ebenso wenig Anhalt bot er für die Aktivierung des klassischen Komplementweges, so daß die bei ihm aufgetretene Reaktion über einen anderen Mechanismus abgelaufen sein muß. Zu diskutieren sind dabei die Bildung spezifischer IgE - Antikörper, die unter

Umgehung des Komplementsystems zu einer Histaminfreisetzung führen könnten, und die noch unklare Interaktion zwischen spezifischen IgG4 - Antikörpern und Histamin freisetzenden Zellen. Zweiteres wurde beispielsweise schon bei einem Patienten mit Hämophilie A, der eine allergische Reaktion unter Faktor VIII - Gabe entwickelte, und im Rahmen von Erkrankungen mit immunologischen Störungen - wie der cystischen Fibrose und der atopischen Dermatitis - beschrieben (Shakib et al., 1979).
Schlecht einfügen würde sich in beide Theorien allerdings die erstaunlicherweise bei dem von mir untersuchten Patienten vorhandene deutliche Abnahme der gesamthämolytischen Aktivität des klassischen Weges, für die bei den übrigen Analysen kein Pendant gefunden werden konnte.

6. Allgemeine Wirkungen der l-Asparaginase auf das Komplementsystem unabhängig von allergischen Reaktionen

Die bisher beschriebene akute Komplementaktivierung innerhalb von Minuten bei allergischen Reaktionen ist zu trennen von einer chronischen Aktivierung des Systems, die klinisch nicht auffällig wird. Dieser chronische Verlauf ist in erster Linie gekennzeichnet durch eine Hypokomplementämie in Verbindung mit dem Vorhandensein typischer Spaltprodukte.

Shapiro et al. (1979) konnten in ihrer Studie unter l-Asparaginase eine allgemeine Hypokomplementämie aufzeigen. Da jedoch weder Spaltprodukte von Faktor B noch von C3 nachgewiesen werden konnte, schloß man als Ursache für die Hypokomplementämie auf eine l-Asp-vermittelte Synthesehemmung der diversen Komponenten. Andere Autoren präzisierten diese Annahme, indem z.B. ein Zusammenhang zwischen der hepatotoxischen Wirkung der l-Asparaginase und der Synthese verschiedener Komplementfaktoren in der Leber gefordert wurde (Kalwinsky et al., 1976).
Hinweisend möchte ich noch einmal in Erinnerung rufen, daß l-Asparaginase ähnliche Effekte auch auf das Gerinnungssystem ausübt, das im übrigen auch mit dem Komplementsystem über verschiedene Beeinflussungsmöglichkeiten verknüpft ist.

Die Resultate der Komplementanalysen im Verlauf der Therapie mit l-Asparaginase bei den von mir beobachteten Patienten sind schon an anderer Stelle ausführlich dargelegt worden. Zusammengefasst kommt es zu einer Reduktion von C3 und der gesamthämolytischen Aktivität des klassischen Weges, sowie stärker ausgeprägt der lytischen Kapazität des alternativen Weges (AP 50) und von Faktor B. Überraschenderweise scheinen die C4-Konzentrationen nicht durch die l-Asp-Therapie beeinflusst zu werden; die Ursachenklärung hierfür - nicht beeinträchtigte, normale Synthese oder verminderter Abbau - steht noch aus. Auffällig ist auch, daß der alternative Weg der Aktivierung im Gegensatz zur akuten Komplementaktivierung bei allergischen Reaktionen unter l-Asp stärker betroffen ist als der klassische.
Da mit diesen chronischen Veränderungen weder Spaltprodukte von C3 noch von Faktor B entsprechend den Ergebnissen anderer Autoren (s.o.) nachgewiesen werden konnten, scheidet die Möglichkeit einer Komplementaktivierung als Ursache der Hypokomplementämie aus.
Die rocketelektrophoretisch bestimmten C3d - Konzentrationen unterliegen unter der l-Asp-Therapie sogar einem zunehmenden Rückgang. Das zeigt neben der Nichtaktivierung des Komplementsystems einen zusätzlichen Hypokatabolismus an. Es entsteht weniger C3d, da die Ursprungskomponente C3 ebenfalls aufgrund verminderter Synthese mengenmäßig abnimmt.

Die in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse weisen als Resumée also auf die verminderte Synthese von Komplementfaktoren als Ursache der Hypokomplementämie hin.
Ob dieser Effekt allerdings auf toxische Wirkungen der l-Asp auf die entsprechenden Synthesezellen allein zurückzuführen ist, bleibt noch zu klären.

Mögliche Konsequenzen der Hypokomplementämie bestehen in der verminderten Opsonisierungskapazität der Seren dieser Patienten besonders für gramnegative Bakterien. Im Rahmen unserer Studie sind jedoch keine schwerwiegenden Infektionen unter der l-Asparaginase-Behandlung aufgetreten.

7. Kreuzreaktivität von E.coli und Erwinia l-Asparaginase

Dellinger et al.(1976) beschrieben bei 1 von 9 Patienten, die unter E.coli l-Asp-Therapie allergische Reaktionen entwickelt hatten, bei Fortsetzung der Behandlung mit Erwinia l-Asp erneut eine anaphylaktische Symptomatik. Ähnlich ermittelten Evans et al. (1982) Beziehungen zwischen der Sensibilisierung mit E.coli und Erwinia l-Asparaginase derart, daß Patienten nach allergischen Ereignissen unter E.coli l-Asp auch bei der Fortführung mit Erwinia l-Asp diesbezüglich stärker gefährdet sind.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde in den von mir untersuchten Fällen mit allergischen Reaktionen unter E.coli l-Asp die Fortführung der Behandlung mit Erwinia l-Asp gut toleriert.
Der Grund der Diskrepanz zu den obigen Autoren ist möglicherweise darin zu suchen, daß die allergischen Reaktionen hier erst im letzten Teil der Therapie auftraten, so daß nur noch wenige Erwinia-Verabreichungen erfolgten. Das Intervall für eine eigenständige, spezifisch gegen Erwinia l-Asp gerichtete Sensibilisierung war dementsprechend wahrscheinlich zu kurz.
Andererseits berichtete Dellinger (s.o.) von Patienten, die schon bei der ersten Erwinia l-Asp-Verabreichung nach der Umstellung allergisch reagierten. Dieser Befund ist sicherlich als Zeichen für das Vorhandensein kreuzreagierender Antikörper gegen beide l-Asp Arten zu werten.

Durch in vitro Versuche ließ sich jedoch eine relevante Kreuzreaktivität der spezifischen Anti-E.coli l-Asp-Antikörper gegen Erwinia l-Asp nicht bestätigen. Die Kreuzreaktivität stellt sich so gering dar, daß sie für praktische Belange wahrscheinlich vernachlässigt werden kann.
Daher scheint auch in Zukunft der Wechsel von E.coli zu Erwinia l-Asparaginase nach aufgetretenen allergischen Reaktionen gerechtfertigt zu sein.

3. Spekulation

Wenn die Immunkomplex-induzierte Komplementaktivation tatsächlich der ausschlaggebende Mechanismus ist, der zu allergischen Reaktionen führt, könnten diese eventuell verhindert werden.
Die stattfindende Komplementaktivierung ist in der Regel am stärksten ausgeprägt in der Nähe des Äquivalenzpunktes zwischen Antigen und Antikörper. Unter hohem Antigen - oder Antikörperüberschuß ist sie zu vernachlässigen. So könnte die Veränderung der Antigen-Antikörper-Relation über die Vermeidung einer Komplementaktivierung zur Unterbindung allergischer Reaktionen beitragen.
Die therapeutische Konsequenz bestände in der hochdosierten Verabreichung des Medikamentes in Antigen-(=l-Asp) überschuß. Derartig behandelte Patienten müssten dennoch sorgfältig überwacht werden, da sich Serumkrankheit - ähnliche Symptome entwickeln könnten. In den nun mehr als 10 Jahren klinischer Erfahrung mit l-Asparaginase hat dieses Medikament jedoch keine nephritogenen Antigenwirkungen gezeigt.
Zusätzlich sind noch genaue Untersuchungen das Komplementsystem und andere immunologische Reaktionsweisen betreffend bei Patienten unter l-Asp-Therapie zu fordern, um auch umgekehrt ausschließen zu können, daß bei Fehlen einer Komplementaktivierung anaphylaktische Reaktionen auftreten.

Schließlich bleibt zu prüfen, ob die chemische Modifikation der l-Asparaginase unter Beibehaltung ihrer antileukämischen Eigenschaften zu einer Verminderung der Immunogenität beitragen kann. Isoenzyme der l-Asp mit verschiedenen spezifischen Aktivitäten weisen evtl. auch unterschiedliche Wirkungen als Antigen auf, was bei der Herstellung der l-Asp-Präparate berücksichtigt werden könnte.

VII. Zusammenfassung

L-Asparaginase wird zum gegenwärtigen Zeitpunkt weitverbreitet als erfolgreiches Medikament in der Behandlung akuter lymphoblastischer Leukämien (ALL) des Kindes— und Erwachsenenalters eingesetzt. Das Enzym zeigt jedoch immunogene Nebenwirkungen beim Menschen und kann zu hypersensitiven Reaktionen führen. Die immunologische Ursache dieser Reaktionen ist noch unklar. Da die Gegenwart l-Asparaginase spezifischer IgG - Antikörper besser mit klinischen Reaktionen zu korrelieren scheint als IgE - Antikörper und von IgG - Antikörpern bekannt ist, daß sie befähigt sind, Komolement zu binden und zu aktivieren, kann vermutet werden, daß der Mechanismus der hypersensitiven Reaktionen eher Komplement - als IgE - vermittelt ist.
Es wurden 24 Kinder mit ALL (Alter 2 - 15 Jahre) auf Veränderungen im Komplementsystem unter l-Asp-Infusionen hin untersucht. Die Therapie wurde nach den Richtlinien des COALL 82 Protokolls verabreicht, das die Nachfolge zum COALL 80 Protokoll darstellt (jüngst veröffentlicht von Winkler et al., 1983).

Die Bildung spezifischer Antikörper der IgG - und IgM - Klasse gegen l-Asp wurde durch einen solid phase ELISA-Test gemessen. Die immunologische Reaktionsbereitschaft der Patienten varrierte individuell über einen weiten Bereich, aber insgesamt wurde die Bildung beider Antikörperarten induziert.

Anaphylaktische Reaktionen wurden jeweils einmalig bei 8 Kindern beobachtet. Die Infusionen bei den übrigen 16 Patienten wurden ohne klinische Reaktionen toleriert. Eine signifikante Komplementaktivierung wurde bei 7 von 8 Fällen mit allergischen Reaktionen und bei keinem der klinisch gut tolerierten Fälle festgestellt. Der wichtigste Parameter für eine stattgehabte Aktivierung war das C3 - Spaltprodukt C3d, gemessen in EDTA-Plasma.

Schlußfolgernd kann die Anaphylaxie unter l-Asp-Therapie bei Patienten mit ALL in den meisten Fällen erklärt werden durch eine akute Komplementaktivierung, die induziert wird durch die Bildung von Antikörpern aus l-Asp und spezifischen IgM - und IgG - Antikörpern.

VII . Literaturverzeichnis

Atkinson JP, Frank MM: Complement. In: Clinical Immunology I. Parker CW (Hrsg). Seite 219. Saunders, Philadelphia, London, Toronto (1980)

Bierling R: Experimental investigations on problems of the clinical use of l-Asparaginase. In: Grundmann E, Oettgen HF (Hrsg). Experimental and clinical effects of l-Asparaginase. RRCR, Springer, Heidelberg. Seite 115 (1970)

Brandslund I, Teisner B, Hole P, Grudzinskas JG, Svehag SE: Complement activation in shock associated with a surgically provoked bacteriaemia. Acta path. microbiol. immunol. scand. Sect. C, 91: 51 (1983)

Broome JD: Evidence that the l-Asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. Nature, 191: 1114 (1961)

Broome JD: Evidence that the l-Asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. I. Properties of the l-Asparaginase of guines pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. J. exp. Med. 118: 99 (1963)

Broome JD: Evidence that the l-Asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. II. Lymphoma 6C3HED cells cultured in a medium devoid of l-Asparaginase lose their susceptibility to the effects of guinea pig serum in vivo. J. exp. Med. 118: 121 (1963)

Broome JD: Studies on the mechanism of tumor inhibition by l-Asparaginase. J. exp. Med. 127: 1055 (1968)

Burchenal JH: A summary of the clinical status of Asparaginase. In: Grundmann E, Oettgen HF (Hrsg). Experimental and clinical effects of l-Asparaginase. RRCR, Springer, Heidelber. Seite 350 (1970)

Campbell HA, Mashburn LT: L-Asparaginase EC-2 from E.coli. Some substrate specifity characteristics. Biochemistry 8: 3768 (1969)

Carbone PP, Haskell CM, Leventhal BG, Block JB, Selawry OS: Clinical experience with l-Asparaginase. In: Grundmann E, Oettgen HF (Hrsg). Experimental and clinical effects of l-Asparaginase. RRCR, Springer, Heidelberg. S. 236 (1970)

Carpentieri U, Balch MT: Hyperglycemia associated with the therapeutic use of l-Asparaginase: Possible role of insulin receptors. J. Ped. 93, No.5: 775 (1978)

Chakrabarty AK, Friedman H: L-Asparaginase-induced immunosuppression, effects on antibody-forming cells and serum titers. Science 167: 869 (1970)

Clementi A: La desamidation enzymatique de L'asparagine chez les differentes especes animales et la signification physiologique de sa presence dans l'organisme. Arch. int. Physiol. 19: 369 (1922)

Cooper NR, Morrison DC: Binding and activation of the first component of human complement by a lipid A region of polysaccharides. J. immunol. 120: 1862 (1978)

Cooper NR: The complement system. In: Fudenberg HH, Stites DP Stobo J, Wells JV (Hrsg). Basic and clinical immunology. 4th edn. Lange Medical Publications, Los Altos,CA, S.124 (1982)

Czop J, Nussenzweig V: Studies of the mechanism of solubilization of immune precipitates by serum. J. Exp. Med. 143: 615 (1976)

Daha MR, Fearon DT, Austen KF: C3 Nephritic Factor (C3NeF): Stabilization of fluid phase and cell-bound alternative pathway convertase. J. Immunol. 116: 1 (1976)

Day NK, Good RA: Biological amplification systems in immunology. Plenum, New York.(1977)

Dellinger CT, Miale TD: Comparison of anaphylactic reaction to Asparaginase derived from E.coli and from Erwinia cultures. Cancer 38: 1843 (1976)

Deutsch E, Fischer M, Frischauf H, Honetz N, Lechner K, Pesendorfer F, Stych H, Weissmann A: Blood coagulation changes under l-Asparaginase therapy. In: Grundmann E, Oettgen HF (Hrsg). Experimental and clinical effects of l-Asparaginase. RRCR, Springer, Heidelberg. S. 331 (1970)

Dierich MP, Landen B: Complement bridges between cells. J. Exp. Med. 146: 1484 (1977)

Dohlwitz A, Franzen S, Holmgren A, Killander A, Killander D, Wide L, Ahström L: Studies on antibody formation in patients treated with l-Asparaginase. In: Grundmann E, Oettgen HF (Hrsg). Experimental and clinical effects of l-Asparaginase. RRCR, Springer, Heidelberg. S.198 (1970)

Ehlenberger Ag, Nussenzweig V: The role of membrane receptors for C3b and C3d in phagocytosis. J. Exp. Med. 145: 357 (1977)

Elhag KM, Bettelheim KA, Huber TJ: Antibodies to bacterial l-asparaginases. NZ med. J. 86:280 (1977)

Ellerson JR, Yasmeen D, Painter RH, Dorrington KJ: A fragment corresponding to the CH2 region of immunoglobulin (IgG) with complement fixing activity. FEBS Letters 24: 318 (1972)

Evans WE, Tsiatis A, Rivera G, Murphy SB, Dahl GV, Denison M Crom WR, Barker LF, Mauer AM: Anaphylactoid reactions to Escherichia coli and Erwinia asparaginase in children with leukemia and lymphoma. Cancer 49: 1378 (1982)

Ghebrehiwet B, Müller-Eberhard H: C3e: An acidic fragment of human C3 with leukocytosis-inducing activity. J. Immunol. 123, No.2: 616 (1979)

Hall JG: The partitioning of l-Asparaginase between blood lymph. In : Grundmann E, Oettgen HF (Hrsg). Experimental and clinical effects of l-Asparaginase. RRCR, Springer, Heidelberg. S. 75 (1970)

Hamilton-Fairley G, Malpas JS, Galton DAG: Clinical experience with l-Asparaginase. In: Grundmann E, Oettgen HF (Hrsg). Experimental and clinical effects of l-Asparaginase. RRCR, Springer, Heidelberg. S. 257 (1970)

Hoffmann MK, Kappler JW, Hirst JA, Oettgen HF: Regulation of the immune response. Eur. J. Immunol. 4: 282 (1974)

Holland JF, Ohnuma T, Cancer and Leukemia Group B investigators: Asparaginase and amino acids in cancer therapeutics. Cancer Treat. Rep. 65: 123 (1981)

Hugli TE, Müller-Eberhard HJ: Anaphylatoxins: C3a and C5a. Adv. Immunol. 26: 1 (1978)

Irion E, Arens A: Biochemical characterization of l-Asparaginases from E.coli. In: Grundmann E, Oettgen HF (Hrsg). Experimental and clinical effects of l-Asparaginases. RRCR, Springer, Heidelberg. S.39 (1970)

Jacquillat C, Weil M, Bussel A, Loisel JP, Rouesse T, Larrieu MJ, Boiron M, Dreyfus B, Bernard J: Treatment of acute leukemia with l-Asparaginase - preliminary results on 84 cases. In: Grundmann E, Oettgen HF (Hrsg). Experimental and clinical effects of l-Asparaginase. RRCR, Springer, Heidelberg. S. 263 (1970)

Kalwinsky DK, Urmson JR, Stitzel AE, Spitzer RE: Activation of the alternate pathway of complement in childhood acute lymphoblastic leukemia. J. Lab. Clin. Med. 88: 745 (1976)

Khan A, Hill JM: Neutralizing precipitin in the serum of a patient treated with l-Asparaginase. J. Lab. Clin. Med. 73: 846 (1969)

Kidd JG: Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum or rabbit serum. J. exp. Med. 97: 565 (1953)

Kidd JG: Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. II. Studies on the natur of the active serum constituent: histo-logical mechanism of the regression: tests for effects of guinea pig serum on lymphoma cells in vitro: Discussion. J. exp. Med. 98: 583 (1953)

Killander D, Dahlwitz A, Engstedt L, Franzen S, Gahrton G, Gullbring B, Holm G, Holmgren A, Höglund S, Killander A, Kockner D, Mellstedt H, Moe PJ, Palmblad J, Reizenstein P, Skarberg KO, Swedberg B, Uden AM, Wadman B, Wide L, Ahström L: Hypersensitive reactions and antibody forma-tion during l-Asparaginase treatment of children and adults with acute leukemia. Cancer 37: 220 (1976)

Klaus GGB, Humphrey JH: The generation of memory cells. I. The role of C3 in the generation of memory cells. Immunology 33:31 (1977)

Lanzer G: Das Komplementsystem. Lab. med. 5: 157 (1981)

Lauenstein K, Grundmann E, Hobik HP, Madaus WP: Experimental immunosuppression with l-Asparaginase. In: Grundmann E, Oettgen HF (Hrsg). Experimental and clinical effects of l-Asparaginase. RRCR, Springer, Heidelberg. S. 170 (1970)

Laurell CB: Antigen-antibody crossed electrophoresis. Anal. Biochem. 10: 358 (1965)

Loeb E, Hill JM, Hill NO, MacLellan A, Khan A, Alexander TR, Adachi M: Treatment of acute leukemia with l-Asparaginase. In: Grundmann E, Oettgen HF (Hrsg). Experimental and clinical effects of l-Asparaginase. RRCR, Springer, Heidelberg. S. 204 (1970)

Loos M, Vadlamudi S, Meltzer M, Shifrin S, Borsos T, Goldin A: Detection of endotoxin in commercial l-Asparaginase preparations by complement fixation and separation by chromatography. Canc. Res. 32: 2292 (1967)

Mancini G, Carbonara AO, Heremanns JF: Immunochemical quantitation of antigen by single radial immunodiffusion. Immunochem. 2: 235 (1965)

Maral R, Guyonnet JC, Julou L, de Ratould Y, Werner GH: Studies of the immunosuppressive activity of l-Asparaginase. In: Grundmann E, Oettgen HF (Hrsg). Experimental and clinical effects of l-Asparaginase. RRCR, Springer, Heidelberg. S. 160 (1970)

Maral R: Antigenicity of l-Asparaginase and problems of resistance. Experimental study in rabbits and mice. Colloques Internationaux CNRS No. 197: 395

Mashburn LT, Wriston JC: Tumor inhibitory effect of l-Asparaginase from Escherichia coli. Arch. Biochem. 105: 450 (1964)

Mashburn LT, Landin LM: Some physicochemical aspects of l-Asparaginase therapy. In: Grundmann E, Oettgen HF (Hrsg). Experimental and clinical effects of l-Asparaginase. RRCR, Springer, Heidelberg. S. 48 (1970)

Medicus RG, Schreiber RD, Götze O, Müller-Eberhard HJ: A molecular concept of the properdin pathway. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, No.2: 612 (1976)

Müller-Eberhard HJ: Complement. Annual Rev. Biochem. 44: 697 (1975)

Müller-Eberhard HJ: The serum complement system. In: Textbook of immunopathology. Miescher PA, Müller-Eberhard HJ (Hrsg). Grune & Stratton, New York, San Francisco, London. S.45 (1976)

Nesbit M, Chard R, Evans A, Karon M, Hammond GD: Evaluation of intramuscular versus intravenous administration of l-Asparaginase in childhood leukemia. Am. J. Ped. Hematol./Oncol. 1: 1 (1979)

Oettgen HF, Old LJ, Boyse EA, Campbell HA, Philips FS, Clarkson BD, Tallal L, Leeper RD, Schwartz MK, Kim JH: Inhibition of leukemias in man by l-Asparaginase. Cancer Res. 27, Part I: 2619 (1967)

Oettgen HF, Tallal L, Tan CC, Murphy ML, Clarkson BD, Golbey RD, Krakoff IH, Karnofsky DH, Burchenal JH: Clinical experience with l-Asparaginase. In: Grundmann E, Oettgen HF (Hrsg). Experimental and clinical effects of l-Asparaginase. RRCR, Springer, Heidelberg. S. 219 (1970)

Old LJ, Boyse EA, Campbell HA, Brodey RS, Fidler J, Teller JD: Treatment of lymphosarcoma in the dog with l-Asparaginase. Cancer 20: 1066 (1967)

Peterson RG, Handschumacher RE, Mitchell MS: Immunological responses to l-Asparaginase. J. Clin. Invest. 50: 1080 (1971)

Platts-Mills TAE, Ishizaka K: Activation of the alternate pathway of human complement by rabbit cells. J. Immunol. 113: 348 (1974)

Porter RR, Reid KBM: Activation of the complement system by antibody-antigen complexes: the classical pathway. Adv. Prot. Chem. 33: 1 (1979)

Pütter J: Pharmacokinetic behaviour of l-Asparaginase in men and in animals. In: Grundmann E, Oettgen HF (Hrsg). Experimental and clinical effects of l-Asparaginase. RRCR, Springer, Heidelberg. S. 64 (1970)

Ramsay NKC, Coccia PF, Krivit W, Nesbit ME, Edson JR: The effect of l-Asparaginase on plasma coagulation factors in acute lymphoblastic leukemia. Cancer 40: 1398 (1977)

Schäffner H, Hädge D: Zur Beeinflussung der humoralen Immunantwort der Maus gegen Proteinantigene mit l-Asparaginase. Allergie und Immunologie 23: 24 (1977)

Schwartz MK: The distribution and clearance of l-Asparaginase. In: Grundmann E, Oettgen HF (Hrsg). Experimental and clinical effects of l-Asparaginase. RRCR, Springer, Heidelberg. S. 58 (1970)

Shakib F, Stanworth DR: IgG4: a possible mediator of anaphylaxis in a haemophiliac patient. Clinical Allergy 9: 597 (1979)

Shapiro R, Youngki K, Michael AF, Gerrard JM, Nesbit ME, Coccia P, Ramsay NKC, Krivit W: L-Asparaginase-induced hypocomplementemia in acute lymphocytic leukemia (ALL) in childhood. AM. J. Ped. Hematol./Oncol. 1: 5 (1979)

Spiegel RJ, Echelberger CK, Poplack DG: Delayed allergic reactions following intramuscular l-Asparaginase. Med. Ped. Oncol. 8: 123 (1980)

Sundsmo JS, Fair DS: Relationships among the complement, kinin, coagulation and fibrinolytic systems. Springer Seminars of Immunopathology 6, No.2/3: 231 (1983)

Teisner B, Brandslund I, Grunnet N, Hansen LK, Thellesen J, Svehag SE: Acute complement activation during an anaphylactoid reaction to blood transfusion and the disappearance rate of C3c and C3d from the circulation. J. Clin. Lab. Immunol. 12: 63 (1983)

Theophilopoulos AN, Dixon FJ: The biology and detection of immune complexes. Advanc. in immunol. 28: 89 (1979)

Vadlamudi S, Padarathsingh M, Bonmassar E, Waravdekar V, Goldin A: Studies on neutralization of l-Asparaginase activity in vitro and in vivo. Cancer 27: 1321 (1971)

Verhaegen H, DeCock W, DeCree J, Verbruggen F: Increase of serum complement levels in cancer patients with progressing tumors. Cancer 38: 1608 (1976)

Voller A, Bidwell D, Bartlett A: Enzyme-linked immunosorbent assay. In: Rose NR, Friedman H (Hrsg). Manual of clinical Immunology. Am. Soc. Nicrobiol. S. 359 (1980)

Wahn V: Hereditäre Komplementdefekte. Monatsschr. Kinderheilkd. 131: 765 (1983)

Wahn V, Fabry U, Körholz D, Reinhardt D, Jürgens H, Göbel U: Modified pharmacokinetics of l-Asparaginase from E.coli by formation of specific antibodies to l-Asparaginase of different immunoglobulin-classes in children with acute lymphocytic leukemia. Ped. Pharmacol. 3: 303 (1983)

Wahn V, Good RA, Gupta S, Pahwa S, Day NK: Evidence of persistent IgG-IgA circulating immune complexes associated with activation of the complement system in serum of a patient with a common variable immune deficiency: Anaphylactic reactions to intravenous gammaglobulin. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect.C, Suppl. 284, 92: 49 (1984)

Wehinger H, Fürste HO: Intensivierung der Induktionstherapie der kindlichen akuten lymphoblastischen Leukämie mit l-Asparaginase. Klin. Padiatr. 193: 159 (1981)

Weiler JM, Daha MR, Austen KF, Fearon DT: Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein 1H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, No.9: 3268 (1976)

Winkler K, Bero G, Erttmann R, Jürgens H, Göbel U, Gutjahr P, Spaar HJ, Drescher J, Thomas P, Müller-Wickup J, Landbeck G: Therapie der akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindesalter. Onkologie 6: 26 (1983)

Whelan, HA, Wriston JC: Purification and properties of Asparaginase from E.coli. B. Biochem. 8: 2386 (1969)

Ziccardi RJ, Cooper NR: Demonstration and quantitation of activation of the first component of complement in human serum. J. Exp. Med. 147: 385 (1978)

Ziccardi RJ: Spontaneous activation of the first component of human complement (C1) by an intramolecular autocatalytic mechanism. J. Immunol. 128: 2500 (1982)

Teile dieser Doktorarbeit wurden in folgendem, zur Zeit noch in Druck befindlichem Artikel veröffentlicht:

Fabry U, Körholz D, Jürgens H, Göbel U, Wahn V:

Anaphylaxis to l-Asparaginase during treatment for acute lymphocytic leukemia in children - evidence of a complement-mediated mechanism

Pediatric Research (1985)

Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Göbel dafür danken, daß er die Durchführung dieser Studie ermöglicht hat.

Allen Schwestern und Ärzten der Station KC 11 sei gedankt für die freundliche Unterstützung bei der Erfassung der Patienten und der Probengewinnung.

Für die freundliche Aufnahme und Hilfe im Rahmen der laboratoriellen Zusammenarbeit danke ich herzlich Fr. Mons und Fr. David.

Besonderer Dank gebührt Herrn Priv. Doz. Dr. V. Wahn. Er hat mir nicht nur freundlicherweise dieses ergiebige Thema überlassen, sondern stand allzeit als Ansprechpartner bei auftauchenden Problemen mit wertvollen Anregungen zur Verfügung.

Ursula Fabry

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geburtsdatum:	13. August 1959
Eltern:	Hans und Sofie Fabry, Kaufleute
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Religion:	Römisch-Katholisch

Schulischer Werdegang:

Grundschule:	1966 - 1969 in Steinforth
Gymnasium:	1969 - 1979 Schule Marienberg in Neuss,
	1978 Erhalt der Allgemeinen Hochschulreife
Studium:	1978 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Düsseldorf,
	1980 ärztliche Vorprüfung
	1981 erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung,
	1983 zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung,
	1984 dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung,
	Approbation als Arzt.